

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Odontología
MÁSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS



TRABAJO FIN DE MÁSTER

**Efecto de unas membranas nanoestructuradas, cargadas o
no con doxiciclina, para la liberación controlada de
fármacos, en un modelo de *biofilm* oral *in vitro***

AUTOR
Verónica Odeh Olmeda

TUTOR
David Herrera González

Madrid, Junio 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Odontología
MÁSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS



TRABAJO FIN DE MÁSTER

**Efecto de unas membranas nanoestructuradas, cargadas
o no con doxiciclina, para la liberación controlada de
fármacos, en un modelo de *biofilm* oral *in vitro***

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE MÁSTER EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS PRESENTADA POR

Verónica Odeh Olmeda

Tutorizada por el Prof. Dr. David Herrera González

Madrid, Junio de 2018

*La ciencia siempre vale la pena
porque sus descubrimientos, tarde
o temprano, siempre se aplican.*

Severo Ochoa

Agradecimientos

A mi tutor, el Dr. David Herrera, por permitirme robar parte de su tiempo y por haber confiado en mí para realizar esta investigación. Y, en conjunto con el Dr. Mariano Sanz y la Dra. Elena Figuero, gracias por brindarme la oportunidad de colaborar con su equipo de investigación.

Al personal del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología y, en especial, a la Dra. María Sánchez, por haber sido mi guía y mi estímulo, por su dedicación y energía, por su cercanía y por tantas razones.

A mi compañero, el doctorando Jaime Bueno, por haberme contagiado su entusiasmo por la microbiología, pero, sobre todo, por su apoyo, confianza y paciencia.

A mi querido abuelo, quien sin saberlo me regaló hace dos años el libro “La nanotecnología. Explorando un cosmos en miniatura”, diciendo: “Algún día sabrás valorarlo”. Y el día llegó en el momento en que me embarqué en este trabajo. Libro que me permitió tener una visión más amplia y crítica de la nanotecnología y entender la razón de ser de la investigación que aquí se propone.

A todos mis compañeros del máster y amigos.

RESUMEN

Objetivo: Estudiar el efecto antibacteriano de unas membranas nanoestructuradas biocompatibles y activas, de polimetilmetacrilato y las mismas membranas cargadas con doxicilina, para la liberación controlada del antibiótico en un modelo de *biofilm* oral *in vitro*.

Material y métodos: Se empleó un modelo de *biofilm* multi-especies *in vitro*, que incluye colonizadores iniciales (*Streptococcus oralis* y *Actinomyces naeslundii*), tempranos (*Veillonella parvula*), secundarios (*Fusobacterium nucleatum*) y tardíos (*Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*). El *biofilm* se formó sobre discos de hidroxiapatita (HA) estériles y los mismos cubiertos con una membrana comercial de politetrafluor expandido (PTFE), con las membranas nanoestructuradas sin cargar (MNs) y cargadas con doxiciclina (Dox-MNs) y se incubó en condiciones de anaerobiosis a 37°C durante 12, 24, 48 y 72 horas. Cada experimento se llevó a cabo por triplicado. La estructura y la cinética bacteriana del *biofilm* obtenido se estudiaron mediante microscopia electrónica de barrido (SEM) y la técnica cuantitativa de la reacción en cadena de la polimerasa (qPCR), respectivamente. Los resultados se expresaron como recuentos bacterianos en unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL). Para el análisis estadístico, se empleó un modelo lineal generalizado.

Resultados: Sólo las Dox-MNs fueron capaces de reducir significativamente los recuentos bacterianos: para *S. oralis* a las 12, 24 y 48 h frente a HA ($p=0,000$) y en comparación con MNs a las 24 h ($p=0,001$); para *A. naeslundii* a las 48 h de incubación, con respecto a todos los grupos (HA, $p=0,000$; MNs, $p=0,007$; PTFE, $p=0,015$); para *V. parvula* a las 48 h en comparación con HA ($p=0,000$) y a las 72 h frente a MNs ($p=0,004$); para *F. nucleatum* a las 48 h con respecto a HA ($p=0,000$) y para *P. gingivalis* a las 72 h de incubación en comparación con HA ($p=0,049$). *A. actinomycetemcomitans* mostró una tendencia a la significación estadística a las 48 h ($p=0,057$).

Conclusiones: Las membranas fueron capaces de reducir la carga bacteriana con respecto al control de HA, destacando el efecto de las membranas nanoestructuradas cargadas con doxiciclina, que fueron capaces de reducir significativamente la carga bacteriana de los patógenos periodontales estudiados.

Palabras clave: biofilm, regeneración periodontal, membranas, nanofibras, doxiciclina.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	10
2. OBJETIVOS	18
3. HIPÓTESIS	18
4. MATERIAL Y MÉTODO	19
4.1 Cepas utilizadas y condiciones de cultivo	19
4.2 Curvas de crecimiento de las cepas seleccionadas	19
4.3 Fabricación de las membranas nanoestructuras y preparación de los especímenes	21
4.4 Formación del <i>biofilm</i>	22
4.5 Análisis del <i>biofilm</i> mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	24
4.6 Extracción de ADN y Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa (qPCR)	24
4.7 Análisis estadístico	26
5. RESULTADOS	28
5.1 Análisis del <i>biofilm</i> mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	28
5.2 Análisis del <i>biofilm</i> por la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa (qPCR)	30
5.2.1 Bacterias totales	30
5.2.2 Por especie bacteriana	33
6. DISCUSIÓN	43
7. CONCLUSIONES	51
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades periodontales son un conjunto de enfermedades inflamatorias e infecciosas que, si no se tratan, conllevan la destrucción de los tejidos de soporte del diente o periodonto. Se consideran la sexta condición más prevalente, afectando a 743 millones de personas en todo el mundo (Marcenes y cols. 2013). La última Encuesta de Salud Oral realizada en España, en 2015, reportó la presencia de algún signo de patología periodontal en el 80,6% de los adultos jóvenes y en el 88,9% de los adultos mayores, registrándose un aumento de la prevalencia con respecto a los datos de 2010 y 2005. Esta tendencia ha sido atribuida, según expertos, al incremento de la esperanza de vida y al envejecimiento de la población (Noguerol y Llodra 2012). Cabe destacar que España es el país de la Unión Europea con mayor esperanza de vida al nacer, situándose ésta en los 83 años (OECD 2017). También se ha observado una disminución en el número de dientes perdidos y en el porcentaje de pacientes totalmente desdentados (Bravo y cols. 2016, Kassebaum y cols. 2014). Todo ello parece indicar que la prevalencia de la periodontitis continuará ascendiendo en los próximos años (Noguerol y Llodra 2012).

A pesar de ser una enfermedad multifactorial, está bien establecido en la literatura que el factor etiológico primario es la presencia de bacterias patógenas que se adhieren a la superficie de los dientes formando comunidades complejas y estructuralmente organizadas, denominadas *biofilms* (Socransky y Haffajee 2002). Se han identificado más de 700 especies bacterianas en la cavidad oral, de las cuales 400 están presentes en la bolsa periodontal (Paster y cols. 2006). Un estado de salud oral implica un equilibrio entre esta microbiota residente y el huésped, mientras que en las enfermedades periodontales se produce una ruptura de la homeostasis por un mecanismo de disbiosis (Hill y Artis 2010), que conlleva un aumento de la carga microbiana y una alteración de la composición, incrementando el número de bacterias anaerobias Gram-negativas y proteolíticas. Esta alteración de una microbiota simbiótica a una disbiótica es la responsable de la inflamación y la pérdida de hueso en la periodontitis (Darveau y cols. 2012).

En este sentido, se han definido patógenos clave relacionados con el inicio y progresión de la periodontitis como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Paster y cols. 2001, Socransky y Haffajee, 2005). No obstante, la expresión de la enfermedad dependerá de la interacción entre las bacterias, los mecanismos de defensa del huésped y la presencia de factores medioambientales (Cullinan y cols. 2001, Seymour y Taylor, 2004).

El tratamiento de las enfermedades periodontales se basa en la eliminación del agente causal y control de la infección, eliminando el *biofilm* bacteriano que se encuentra a nivel supra y subgingival. Este objetivo puede conseguirse con una instrumentación mecánica no quirúrgica (Cobb 2002) o quirúrgica (Heitz-Mayfield y cols. 2002). Además, la terapia antimicrobiana coadyuvante sistémica o local podría estar indicada para combatir la infección y re-colonización por bacterias periodontopatógenas (Herrera y cols. 2012, Matesanz-Pérez y cols. 2013). Sin embargo, la progresión de las enfermedades periodontales, de gingivitis a periodontitis, se caracteriza por la pérdida irreversible de inserción, con una destrucción progresiva del ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar. Con estas terapias, puede detenerse el proceso inflamatorio de la enfermedad y lograr el mantenimiento de la salud periodontal a largo plazo, pero es poco probable que se reestablezca la anatomía y la función original del periodonto (Lindhe y Nyman 1975). En este sentido, las estrategias de regeneración periodontal están diseñadas para reconstruir el aparato de soporte destruido como consecuencia de la periodontitis, con el objetivo de obtener bolsas poco profundas y fácilmente mantenibles en el tiempo (Cortellini y Tonetti 2015). Actualmente, existe una gran variedad de técnicas y combinación de materiales dirigidos a lograr la regeneración periodontal, como el uso de injertos óseos, membranas no reabsorbibles y reabsorbibles en regeneración tisular guiada (GTR), factores de crecimiento (proteínas derivadas del esmalte, factor de crecimiento derivado de plaquetas, proteínas morfogénicas óseas) y terapias celulares y génicas.

El uso de membranas en GTR apareció en los años 70, en base a los conceptos de Melcher sobre “compartimentalización” (Melcher 1976) y a los hallazgos

histológicos en estudios de regeneración, que sentaron las bases teóricas de las técnicas de regeneración tisular guiada: la regeneración del periodonto (cemento, ligamento periodontal y hueso) puede ser predecible si las células del ligamento periodontal y el hueso se fijan durante la cicatrización sobre la raíz del diente afectado (Nyman y cols. 1982, Karring y cols. 1985) y si se impide la invasión de la herida por células del tejido blando (Nyman y cols. 1980, Karring y cols. 1980, 1985) debido a que no hay evidencia de que exhiban potencial osteogénico (Melcher 1976). Por lo tanto, se comenzaron a emplear membranas como una barrera física que impidiera la entrada de las células del tejido blando en el defecto óseo, permitiendo, al mismo tiempo, la migración de las células del hueso y del ligamento periodontal, con la expectativa de conseguir nuevo cemento, hueso y ligamento periodontal (Rios y cols. 2015, Bartold y cols. 2016). Posteriormente, las técnicas evolucionaron y comenzaron a diseñarse membranas que actuaban no sólo como una barrera física, sino también como sistemas de liberación de agentes específicos, tales como antimicrobianos, factores de crecimiento, agentes bioactivos (fosfato cálcico) o células madre.

Sin embargo, los resultados de la regeneración periodontal son variables y poco predecibles en muchos casos (Needleman y cols. 2006, Bartold y cols. 2016). Consecuentemente, la investigación clínica y preclínica continúa evaluando diferentes terapias que incluyen, entre otras, el uso de nuevas tecnologías para la fabricación de membranas (Ramseier y cols. 2012).

La función principal de las membranas es actuar como una matriz extracelular (ECM) artificial y temporal, fundamental para la adhesión de las células y la posterior migración, proliferación y diferenciación celular que se requiere para la regeneración (Ngiam y cols. 2011, Peng y cols. 2011, Bottino y cols. 2012). Por lo tanto, la membrana ideal para regeneración ósea periodontal debería asemejarse a la morfología natural del hueso y, en particular, a la ECM (Ngiam y cols. 2011). Esta estrategia se conoce como biomimetismo (Ma 2008). El hueso es un tejido conectivo especializado compuesto por elementos orgánicos e inorgánicos, principalmente fibras de colágeno tipo I, con un diámetro de entre 50 y 500 nm ensambladas en una malla porosa con poros interconectados y nanocristales de

hidroxiapatita (HA) (Figura 1) (Rios y cols. 2015, Ma 2008). En este sentido, si el hueso está nanoestructurado, parece que la mejor opción podría ser crear biomateriales nanoestructurados que mimeticen la naturaleza de la ECM (Shin y Mikos 2003, Kubinová y Sykoba 2010, Gardin y cols. 2012). La ventaja de estos materiales reside en su pequeño tamaño, elevada porosidad y una alta relación superficie-volumen (Ngiam y cols. 2011). Parece que estas características mejoran la adhesión de las células y el aporte de nutrientes necesario para su proliferación y diferenciación. Todo ello ha atraído la atención de los investigadores en los últimos años. En este sentido, estudios *in vitro* que han evaluado diferentes membranas nanoestructuradas, demuestran que proporcionan un ambiente más favorable para las células, mejorando la absorción de proteínas (fibronectina, vitronectina, laminina y colágeno) y la adhesión celular (Woo y cols. 2003, Zhang y cols. 2008), así como la diferenciación de osteoblastos y la biomineralización (Woo y cols. 2007, Hu y cols. 2008, Gandhimathi y cols. 2015).

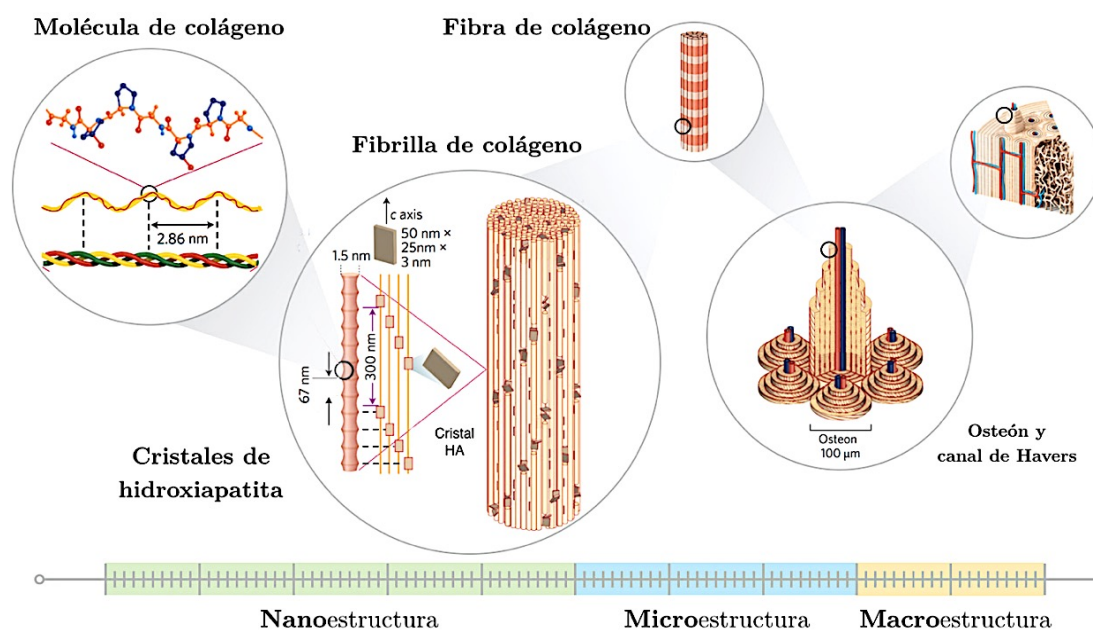


Figura 1.- Esquema representativo de los distintos niveles de la estructura jerárquica del hueso. El hueso está compuesto por hueso compacto y esponjoso. El hueso compacto se compone de osteones que tienen una estructura laminar, con cada laminilla individual compuesta de fibras. Estas fibras son el resultado de varias fibrillas de colágeno, las cuales son los componentes básicos del hueso, que se componen de moléculas de proteína de colágeno (tropocolágeno), formadas a partir de tres cadenas de aminoácidos y nanocristales de hidroxiapatita. Fuente: Saiz y cols. 2013.

Ahora bien, el éxito de las técnicas de regeneración periodontal no sólo depende de conseguir la osteogénesis o cementogénesis sobre la superficie radicular, sino también de la ausencia de infección (Heitz-Mayfield y cols. 2006). Teniendo en cuenta que la cavidad oral representa un hábitat óptimo para la colonización y el crecimiento de microorganismos, las bacterias orales podrían colonizar fácilmente los biomateriales. Además, una de las complicaciones más frecuentes en GTR es la exposición de la membrana, con una prevalencia del 50-100%. Diversos estudios han mostrado que las membranas expuestas están colonizadas por bacterias y que, además, se asocian con una menor ganancia de inserción clínica en defectos intraóseos (Selvig y cols. 1992, Machtei y cols. 1993, Nowzari y Slots 1994, Nowzari y cols. 1995). Todo ello indica la necesidad no sólo de adoptar medidas efectivas en el control de la placa durante el periodo de cicatrización, sino también la importancia de diseñar biomateriales resistentes a los microorganismos para prevenir las complicaciones infecciosas.

Para evitar la infección de la herida, algunos investigadores han administrado antibióticos, sistémicos o locales, o han incorporado agentes antimicrobianos en las membranas para GTR, dotándolas de actividad antibacteriana. Sin embargo, los resultados muestran un éxito parcial. Las razones de ello pueden ser que el fármaco administrado no se dirigiera contra los microorganismos que generaban la infección o bien que no se alcanzara el sitio infectado en una concentración lo suficientemente alta como para inhibir los microorganismos (Zucchelli y cols. 1999).

En este sentido, los avances en el área de la nanotecnología para el diseño de nuevos materiales podrían dar solución a los problemas mencionados. La nanotecnología se define como la ciencia que se encarga del diseño, desarrollo y aplicación de materiales con dimensiones menores de 100 nm (Potocnick 2011). Para vislumbrar lo pequeño que es un nanómetro y a qué escala trabaja la nanotecnología, la Figura 2 muestra una comparación entre tamaños de objetos naturales y los diferentes nanomateriales.

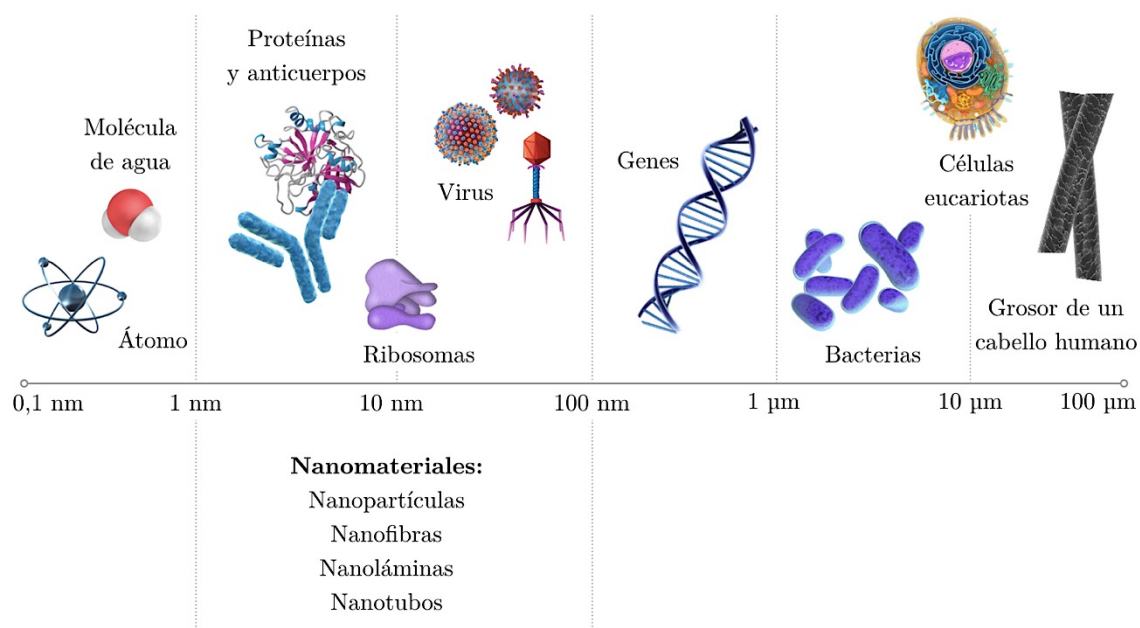


Figura 2.- Diagrama comparativo de tamaños de objetos naturales y nanomateriales. La imagen muestra la equivalencia en tamaño de los nanomateriales a otras estructuras existentes en la naturaleza. Fuente: Acosta y cols. 2016.

En los últimos años se ha introducido en el campo de la medicina y la odontología, con múltiples aplicaciones, no sólo en regeneración de tejidos y hueso, sino también en el ámbito del diagnóstico, prevención, anestesia, odontología restauradora e implantología dental (Bhavikatti y cols. 2014, Fakruddin y cols. 2012, Elkassas y Arafa 2017). La importancia de la nanotecnología reside en la posibilidad de diseñar biomateriales en escala molecular que provoquen respuestas biológicas específicas, con un alto grado de especificidad (Lutolf y Hubbell 2005, Owen y Shoichet 2010), de manera que nuevos materiales nanoestructurados podrían ser empleados para facilitar la regeneración de los tejidos. Otro ámbito de interés para la aplicación de la nanotecnología es en el desarrollo farmacéutico. Los fármacos comerciales presentan algunos problemas como la toxicidad para los tejidos no diana, la dificultad para mantener las concentraciones del fármaco dentro de las ventanas terapéuticas y el metabolismo y excreción, pudiendo reducir la eficacia del tratamiento (Sahoo y cols. 2007). El uso de la nanotecnología podría mitigar estos problemas, permitiendo el diseño de nuevos dispositivos de liberación controlada de fármacos, con una dosis suficiente en el

lugar donde se necesite, y logrando una alta bioactividad local (Ulubayram y cols. 2015, Calamak y cols. 2017).

Entre las diversas técnicas que existen para la producción de nanomateriales, las técnicas de “*electrospinning*” son las más populares (Bruzauskaite y cols. 2016). Se trata de un método económico y eficiente para la fabricación de fibras en escala micro y nanométrica. Las ventajas de obtener fibras en estos rangos son un área superficial grande en relación al volumen, flexibilidad, elevada porosidad, poros interconectados y un rendimiento mecánico superior, haciendo a las nanofibras candidatas óptimas para una variedad de aplicaciones, entre las que se encuentran la regeneración tisular y sistemas de liberación de fármacos. En primer lugar, las técnicas de “*electrospinning*” permiten, frente a otros métodos convencionales, diseñar biomateriales que mimeticen la estructura y función de los tejidos que se desea regenerar. Por otra parte, permiten la liberación controlada de fármacos, logrando una alta bioactividad local y disminución de los efectos secundarios de los antibióticos sistémicos, eliminando el problema de las resistencias bacterianas. Diversos estudios demuestran que las nanofibras pueden ser utilizadas con efectividad para la liberación de los agentes antimicrobianos, reduciendo el riesgo de infección (Ulubayram y cols. 2105). Como se comentó anteriormente, ambos aspectos, crear materiales miméticos y antibacterianos, son clave en el diseño de una membrana ideal para regeneración periodontal. Tanto es así que, recientemente, numerosos grupos de investigación han evaluado el uso de técnicas de “*electrospinning*” para desarrollar membranas nanoestructuradas para regeneración ósea y periodontal (Li y cols. 2006, Pham y cols. 2006, Murugan y cols. 2006, Bottino y cols. 2011).

Osorio y colaboradores (2017) diseñaron y propusieron unas membranas nanoestructuradas bioactivas no-reabsorbibles de polimetilmetacrilato (PMMA) para ser utilizadas en regeneración tisular guiada, cargadas con Calcio y Zinc. Observaron cómo las membranas permitieron la viabilidad celular y propiciaron la precipitación de depósitos de fosfato cálcico. Además, estos cationes metálicos han demostrado tener cierta actividad antimicrobiana (Augustine y cols. 2014, Münchow y cols. 2015, 2016). Por otra parte, entre la gran variedad de

antimicrobianos que se han probado, la doxiciclina ha mostrado resultados beneficiosos (Kaur y cols. 2013, Gireddy y cols. 2107). Además de ser un antibiótico de amplio espectro con actividad antimicrobiana frente a numerosos patógenos periodontales (Pascale y cols. 1986), alcanza concentraciones elevadas en el fluido crevicular gingival (Pascale y cols. 1986, Walker y cols. 1981) y se une a la superficie del diente, prolongando así el efecto terapéutico (Demirel y cols. 1991). Por otra parte, ha demostrado tener propiedades que podrían ayudar en la regeneración periodontal y en la reducción de la progresión de la periodontitis, por su acción anti-colagenolítica y anti-proteolítica (Kaur y Sikri, 2013, Gireddy y cols. 2107). Teniendo en consideración dichas observaciones, el objetivo de la presente investigación fue estudiar el efecto antimicrobiano de unas membranas nanoestructuradas no-reabsorbibles de PMMA, cargadas con doxiciclina, empleando un modelo de *biofilm* subgingival *in vitro* validado sobre discos de hidroxiapatita (HA).

2. OBJETIVOS

El objetivo de esta investigación fue estudiar el efecto antibacteriano de unas membranas nanoestructuradas biocompatibles activas, de polimetilmetacrilato (PMMA) y las mismas cargadas con doxicilina, empleando un modelo validado de *biofilm* oral multi-especies *in vitro* sobre discos de hidroxiapatita.

3. HIPÓTESIS

Las membranas nanoestructuradas activas de polimetilmetacrilato (PMMA) y las mismas cargadas con doxicilina alterarán la cinética de crecimiento y viabilidad bacteriana del *biofilm*.

4. MATERIAL Y MÉTODO

4.1 Cepas utilizadas y condiciones de cultivo

Para la formación del *biofilm* se siguió el modelo de *biofilm* subgingival *in vitro* validado por Sánchez y colaboradores (2011). Se seleccionaron seis especies que se encuentran frecuentemente en la placa subgingival y que incluían colonizadores iniciales (*Streptococcus oralis* y *Actinomyces naeslundii*), tempranos (*Veillonella parvula*), secundarios (*Fusobacterium nucleatum*) y tardíos (*Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) (Tabla 1).

Tabla 1.- Cepas de referencia estándar

Cepa	Referencia
<i>Streptococcus oralis</i>	CECT ¹ 907T
<i>Actinomyces naeslundii</i>	ATCC ² 19039
<i>Veillonella parvula</i>	NCTC ³ 11810
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	DSMZ ⁴ 20482
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	ATCC ² 33277
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	DSMZ ⁴ 8324

¹ CECT, Colección Española de Cultivos Tipo

² ATCC, American Type Cultures Collection

³ NCTC, National Collection of Type Cultures

⁴ DMSZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and ZellKulturen

Las bacterias fueron cultivadas en placas con medio Agar Sangre (Oxoid n^o2; Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra), suplementado con un 5% de sangre de caballo estéril, Hemina (5 mg/L) y Menadiona (1 mg/L), en condiciones de anaerobiosis (10% H₂, 10% de CO₂ y N₂ en equilibrio) a 37°C entre 24-72h.

4.2 Curvas de crecimiento de las cepas seleccionadas

Para estandarizar las condiciones del estudio y permitir así la reproducibilidad del mismo, se inoculó la misma concentración de cada una de las cepas

seleccionadas en todos los ensayos. Para ello, se emplearon las curvas de crecimiento de cada bacteria.

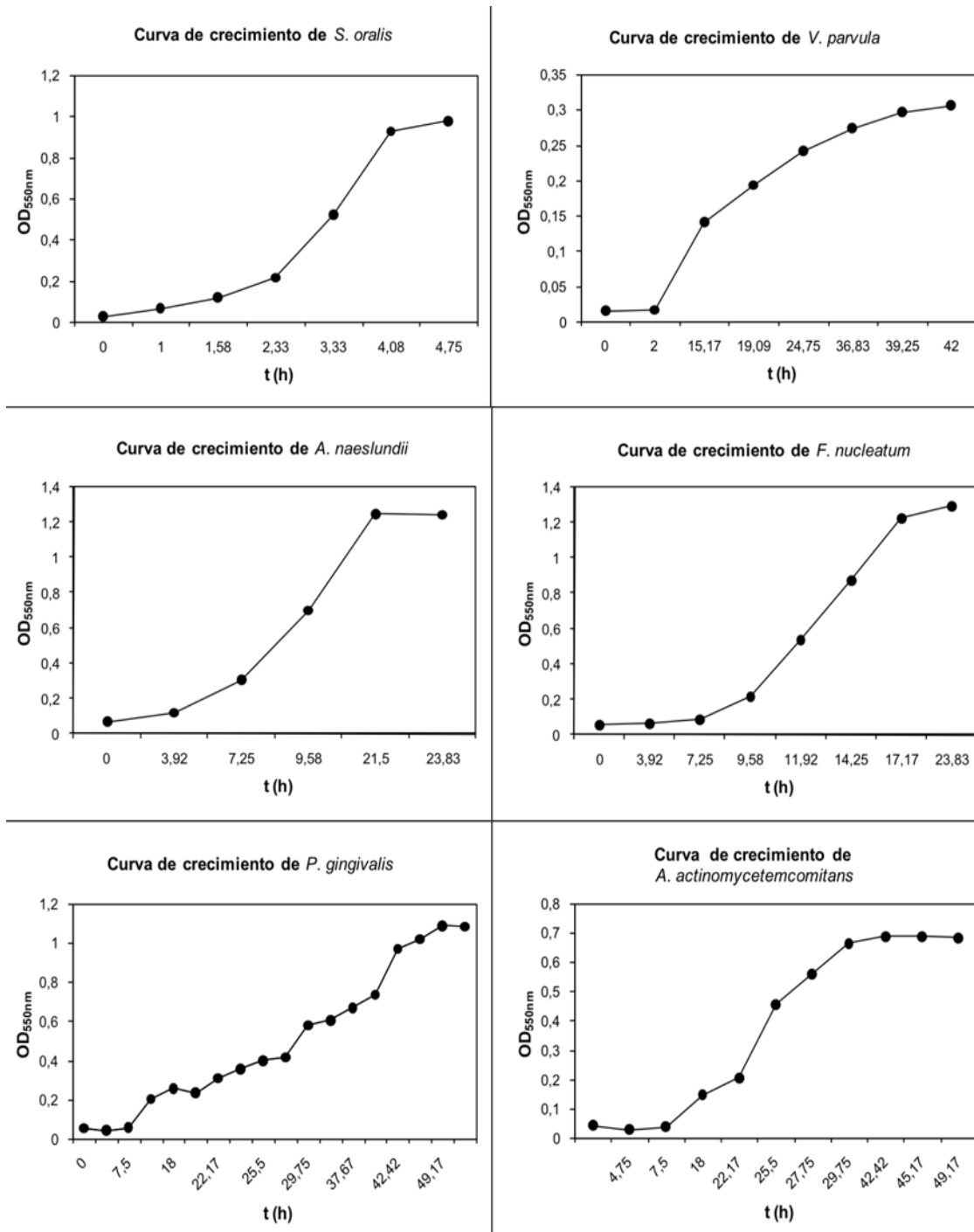


Figura 3. Curvas de crecimiento de las cepas empleadas en el modelo de *biofilm* multi-especies. OD, Densidad óptica medida a 550 nm; t, tiempo; h, horas.

4.3 Fabricación de las membranas nanoestructuras y preparación de los especímenes

Se emplearon 2 tipos de membranas nanoestructuradas diferentes: membranas nanoestructuras activas (MNs) y éstas mismas cargadas con doxiciclina (Dox-MNs), de acuerdo con la preparación descrita por Osorio y cols. (2017). Las membranas se adquirieron en NanoMyP (Granada, España). Fueron fabricadas mediante técnicas de “*electrospinning*” con una mezcla de polímeros (PolymBlend®). El material PolymBlend® está formado con una mezcla de dos copolímeros de alto peso molecular: metil metacrilato-co-hidroxietil metracrilato (MMA-co-HEMA) (promedio de peso molecular, Mw 200 kDa; índice de polidespersidad, PDI < 2,5) y metil metacrilato-co-hidroxietil acrilato (MMA-co-HEA) (promedio de peso molecular, Mw 2000 kDa; índice de polidespersidad, PDI < 1,5) (Figura 4). Los copolímeros se mezclaron para el procesado por “*electrospinning*” en una relación 1:1. PolymBlend® tiene unas propiedades mecánicas y fisicoquímicas adecuadas como una elevada resistencia a la abrasión, resistencia a la tracción, flexibilidad y elasticidad adecuadas, resistencia a los ácidos y bases, resistencia a la temperatura y fácil manejo.

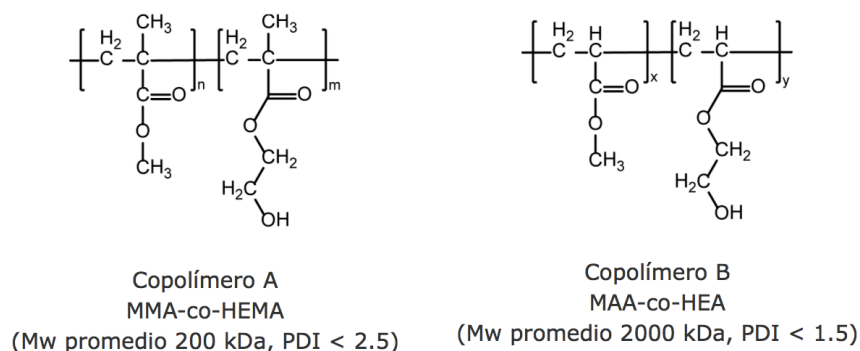


Figura 4. Composición de la membrana nanoestructurada (PolymBlend®)

Posteriormente, las superficies fueron modificadas por funcionalización química. Para la reactivación de la superficie, se hicieron reaccionar con una solución tamponada de carbonato sódico (333 mM; pH=12,5) durante dos horas y lavado profuso con agua. Debido a la hidrólisis parcial de los enlaces éster, los grupos carboxilo quedaron en la superficie. A continuación, las membranas se cargaron

con doxiciclina hclato. Para ello, se introdujeron en 20 ml de solución acuosa con 40 mg/ml de doxiciclina hclato, durante 4 horas bajo agitación continua. Finalmente, las suspensiones fueron centrifugadas (60 minutos, 12.000 rpm, dos ciclos) y las membranas se separaron del sobrenadante. Una vez se obtuvieron las diferentes membranas, se colocaron sobre la superficie de unos discos estériles de hidroxiapatita cálcica (HA) con un diámetro de 7 mm y un grosor de 1,8 mm (desviación estándar, DS=0,2mm) (Clarkson Chromatography Products, Williamsport, PA, EE.UU.). Así pues, se evaluaron 4 grupos diferentes: (1) discos de HA con una membrana activa sin cargar (MNs), (2) discos de HA con una membrana cargada con doxiciclina hclato (Dox-MNs), (3) discos de HA sin membrana y (4) discos de HA con una membrana comercial (CytoPlast®) no reabsorbible de PTFE (politetraflúor expandido). Estos dos últimos grupos se emplearon como control.

4.4 Formación del *biofilm*

Una vez se obtuvieron las curvas de crecimiento y los diferentes materiales, se procedió a la formación del *biofilm* (Figura 5). Para ello, se seleccionó una colonia de cada uno de los cultivos aislados que se hicieron previamente y se inoculó en 15 mL de medio BHI modificado (Brain-Heart infusion) (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EE.UU), suplementado con 2,5 g/L de mucina (Oxoid), 1,0 g/L de extracto de levadura (Oxoid), 0,1 g/L de cisteína (Sigma), 2,0 g/L de bicarbonato de sodio (Merck), 5,0 mg/L de hemina (Sigma), 1,0 mg/L de menadiona (Merck) y 0,25% (v/v) de ácido glutámico (Sigma). Posteriormente, se incubó en anaerobiosis a 37°C hasta alcanzar la fase exponencial media de crecimiento en cada una de las cepas utilizadas. Para saber en qué fase se encontraba el crecimiento bacteriano, se utilizó un espectrofotómetro para medir la densidad óptica (D.O) a 550 nm. A continuación, se preparó un preinóculo mixto con las 6 especies bacterianas a la concentración ajustada por espectrofotometría en un medio de cultivo BHI modificado, conteniendo 10³ unidades formados de colonias por mililitro (UFC/mL) de *S. oralis*, 10⁵ UFC/mL

de *V. parvula* y *A. naeslundii* y 10^6 UFC/mL de *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*.

Los discos de HA se introdujeron en una placa multipocillo estéril (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Alemania) y se vertió 1,5 mL del preinóculo mixto preparado sobre cada uno de ellos. Para comprobar la esterilidad del medio y la ausencia de contaminación, se empleó como control un pocillo con su disco inoculado con BHI modificado, en vez de con el preinóculo mixto. Una vez se prepararon las placas multipocillo, se incubaron en condiciones de anaerobiosis (10% H₂, 10% de CO₂ y N₂ en equilibrio) a 37°C durante 12, 24, 48 y 72 h. Cada experimento se llevó a cabo en triplicado.

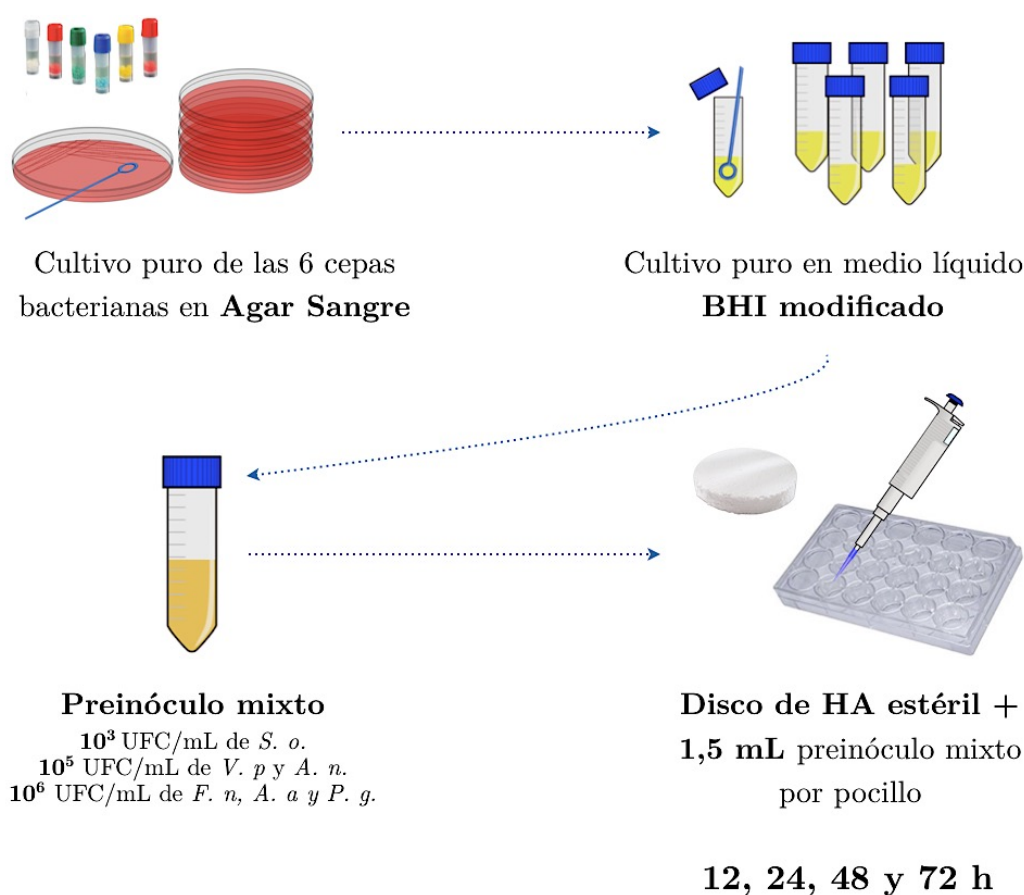


Figura 5.- Representación esquemática del modelo de *biofilm* subgingival multi-especies *in vitro*. Tras cada paso, se incubó en condiciones de anaerobiosis (10% H₂, 10% de CO₂ y N₂ en equilibrio) a 37°C.

4.5 Análisis del *biofilm* mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Para el análisis por microscopía electrónica de barrido, se emplearon los *biofilms* de 72 horas. Para ello, en primer lugar, las muestras se lavaron secuencialmente con 2 mL de PBS estéril para remover las bacterias que no estaban adheridas al disco de HA. El proceso se repitió tres veces (10 segundos de inmersión por lavado). Posteriormente, las muestras se fijaron en una solución de paraformaldehído al 4% y de glutaraldehído al 2,5% durante 4 horas a 4°C; se lavaron en PBS y en agua estéril (tiempo de inmersión por lavado de 10 min) y se deshidrataron a través de una serie de soluciones graduadas de etanol (30, 50, 70, 80, 90 y 100%; tiempo de inmersión por serie de 10 min). A continuación, las muestras se secaron en puntos críticos, se recubrieron con oro por pulverización catódica y se analizaron mediante microscopía electrónica usando un JSM 6400 (JSM6400; JEOL, Tokio, Japón), con un detector de electrones retrodispersados y una resolución de imagen de 25 kV. Los análisis se llevaron a cabo en el Centro Nacional de Microscopía Electrónica (ICTS) (Universidad Complutense de Madrid, España).

4.6 Extracción de ADN y Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa (qPCR)

Antes de la extracción de ADN, los discos fueron lavados secuencialmente con 2 mL de PBS estéril para remover las bacterias que no estaban adheridas al disco de HA. El proceso se repitió tres veces (10 segundos de inmersión por enjuague). El ADN de los *biofilms*, de 12, 24, 48 y 72 horas de evolución, se aisló de todas las muestras utilizando un kit comercial (MolYsis Complete5; Molzym GmgH & CoKG, Bremen, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para detectar y cuantificar el ADN bacteriano, se empleó el método de PCR con sondas de hidrólisis. Los *primers* y sondas fueron obtenidos por Life Technologies Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA), Applied Biosystems (Carlsbad, CA, EUA) y

Roche (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Alemania) y se dirigieron contra el gen 16S rRNA (Tabla 2). La amplificación de la qPCR se realizó en un volumen total de la mezcla de reacción de 10 μ L. Las mezclas de reacción contenían 5 μ L de master Mix 2x (LC 480 Probes Master; Roche), concentraciones óptimas de *primers* y sonda (900, 900 y 300 nM para *S. oralis*; 300, 300 y 300 nM para *A. naeslundii*; 750, 750 y 400 nM para *V. parvula*; 300, 300 y 200 nM para *A. actinomycetemcomitans*; 300, 300 y 300 nM, para *P. gingivalis* y 600, 600 y 300 nM para *F. nucleatum*), y 2 μ L del ADN de las muestras correspondientes. El control negativo fue de 2 μ L de agua estéril (Water PCR grade, Roche). Las muestras se sometieron a un ciclo de amplificación inicial a 95°C durante 10 minutos, seguido de 45 ciclos a 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. Los análisis se realizaron con un termociclador LightCycler® 480 II (Roche). Las placas utilizadas en el estudio fueron FramStar 480 (4titude; The North Barn; Damphurst Lane, Reino Unido), selladas con qPCR Adhesive Clear Seals (4titude).

Cada muestra de ADN fue analizada por duplicado. El valor del ciclo de cuantificación (Cq), describiendo el ciclo de la PCR en el cual la fluorescencia sobrepasa al estado basal, fue determinado usando el software informático (LC 480 Software 1,5; Roche Diagnostic GmbH; Mannheim, Alemania). La cuantificación del número de células vivas detectadas por qPCR se basó en curvas estándar. La correlación entre los valores Cq y las UFC/mL fue generado automáticamente a través del software (LC 480 Software 1,5; Roche).

Tabla 2.- *Primers* y sondas utilizados para la cuantificación del ADN genómico de cada bacteria.

Bacteria	Secuencia (5´- 3´)	Longitud (pb)
<i>So</i>		
Forward	CAACGATACATAGCCGACCTGAG	97
Reverse	TCCATTGCCGAAGATTCC	
Sonda	6FAM-CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA-BBQ	
<i>Vp</i>		
Forward	TGCTAATACCGCATACGATCTAACC	66
Reverse	GCTTATAAATAGAGGCCACCTTTCA	
Sonda	6FAM-CTATCCTCGATGCCGA-TAMRA	
<i>An</i>		
Forward	GGCTGCGATACCGTGAGG	103
Reverse	TCTGCGATTACTAGCGACTCC	
Sonda	6FAM- CCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGAT-BBQ	
<i>Pg</i>		
Forward	GCGCTCAACGTTTCAGCC	67
Reverse	CACGAATTCCGCCTGC	
Sonda	6FAM-CACTGAACTCAAGCCCGGCAGTTTCAA-TAMRA	
<i>Aa</i>		
Forward	GAACCTTAC CTACTCTTGACATCCGAA	80
Reverse	TGCAGCACCTGTCTCAAAGC	
Sonda	6FAM-AGAACTCAGAGATGGTTGTGCCTTAGG-GTAMRA	
<i>Fn</i>		
Forward	GGATTTATTGGGCGTAAAGC	162
Reverse	GGCATTCTACAAATATCTACGAA	
Sonda	6FAM-CTCTACACTTGTAGTTCCG-TAMRA	

So, *S. oralis*; *Vp*, *V. parvula*; *An*, *A. naeslundii*; *Aa*, *A. actinomycetemcomitans*; *Fn*, *F. nucleatum*; *Pg*, *P. gingivalis*; pb, pares de bases.

4.7 Análisis estadístico

Los análisis se realizaron con el programa SPSS 21.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, EEUU). Los datos se sometieron al test de Shapiro-Wilk para contrastar la normalidad del conjunto de la muestra. La variable dependiente empleada para comparar el *biofilm* formado en las diferentes superficies fue las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL), evaluada para las bacterias

totales e individualmente para cada especie bacteriana (*S. oralis*, *A. naeslundii*, *V. parvula*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *F. nucleatum*). Los datos fueron expresados como medias, con sus desviaciones estándar (DE). El efecto de cada material en el recuento de bacterias totales se evaluó mediante un test paramétrico tipo ANOVA para muestras independientes. Si los resultados mostraron diferencias significativas entre los grupos, se aplicaron las correcciones de Bonferroni para comparaciones múltiples. Para el análisis por especie bacteriana, se realizó un modelo lineal generalizado para comparar los efectos de cada una de las MNs y su interacción con la variable dependiente (UFC/mL), en función del tiempo de incubación, usando el método de máxima verosimilitud y las correcciones de Bonferroni para comparaciones múltiples. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos con una $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Análisis del *biofilm* mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Se comprobó la formación del *biofilm* a las 72 h de incubación sobre cada espécimen, así como la morfología del disco de HA sin membrana o con las diferentes membranas empleadas (Figura 6).

En los discos de HA sin membrana, utilizados como control de la formación del *biofilm in vitro*, se observó la presencia de bacterias sobre la superficie, bien como células individuales formando cadenas, características del género *Streptococcus* pero también de *Aggregatibacter* (Figura 6b, flecha blanca), o como agregados multicelulares, mostrando una organización estructural basada principalmente en la co-agregación célula a célula (Figura 6b). También pudo reconocerse en el *biofilm* los bacilos fusiformes característicos del género *F. nucleatum*, agrupados en una red tridimensional que parece conformar la estructura de la comunidad sésil (Figura 6b, flecha roja). Los discos con MNs activa, previo a la formación del *biofilm*, revelaron la estructura característica de las membranas con fibras a escala nanométrica (Figura 6c). Tras 72 h de incubación se pudo observar la morfología típica de un *biofilm*, formando una gruesa capa de bacterias. De nuevo, la especie bacteriana *F. nucleatum* parece jugar un papel estructural clave, formando las redes bacterianas con micro-colonias adheridas (Figura 6d). El análisis de los discos con MNs cargadas con doxicilina también permitieron observar las nanofibras características de la membrana (Figura 6e). Únicamente en este grupo de muestras se pudieron observar diferencias relevantes, reconociéndose muy pocas bacterias en la superficie (Figura 6f), y de ellas, una alta proporción con daño a nivel estructural. La superficie de los discos con la membrana comercial (Cytoplast®) mostraron una morfología muy diferente a la de las membranas nanoestructuradas (Figura 6g), con un entramado hexagonal característico. Parece que el *biofilm* mostró afinidad por estas localizaciones. Sin embargo, tras 72 horas de evolución, también se encontró distribuido sobre el resto de la superficie (Figura 6h).

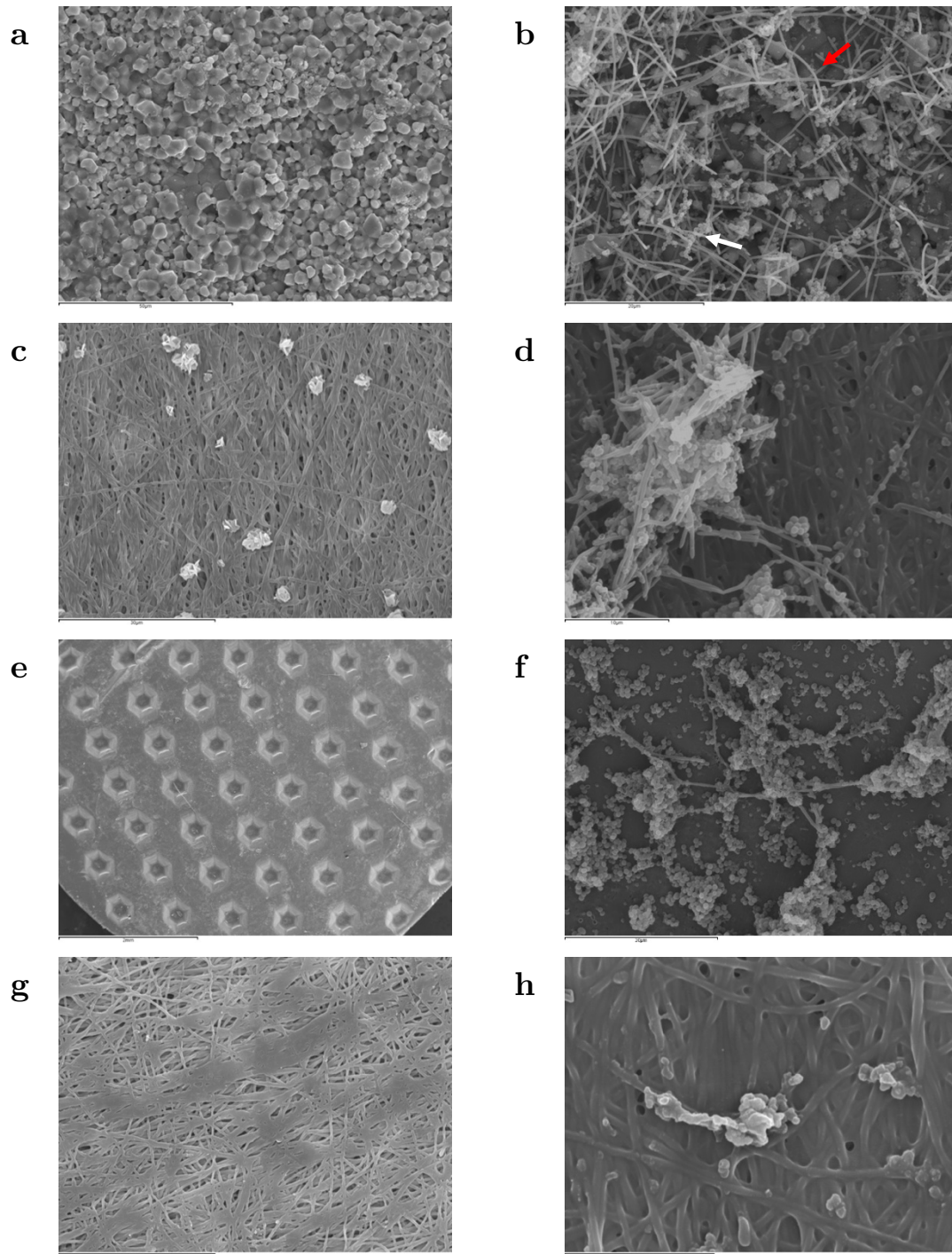


Figura 6.- Microscopía electrónica de barrido (SEM) del material y *biofilms* de 72 horas de evolución en (a,b) discos de hidroxiapatita (HA) sin membrana; (c,d) con la membrana comercial de PTFE; (e,f) la membrana nanoestructurada sin cargar (MN) y (g,h) MNs cargadas con doxicilina (Dox-MNs). Se pudo observar una población bacteriana densa en los discos de HA en todos los casos, formando capas discontinuas de bacterias adheridas a las membranas, excepto para *biofilms* en discos Dox-MNs, donde no se pudo identificar dicha estructura característica del *biofilm*, encontrando pocas células dispersas por la superficie del disco (h). Pueden reconocerse cadenas de estreptococos y/o *Agregatibacter* (Flechas blanca) y bacilos fusiformes del género *F. nucleatum* (Flecha roja). Aumento (A-H): 1.000X

5.2 Análisis del *biofilm* por la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa (qPCR)

5.2.1 Bacterias totales

Al estudiar el efecto de las membranas sobre el total de las bacterias involucradas en la formación del *biofilm in vitro*, se pudo comprobar cómo, desde las 12 a las 72 horas de incubación, el recuento bacteriano fue menor en el caso de las membranas nanoestructuradas cargadas con doxiciclina (Dox-MNs), en comparación con el resto de materiales probados (Figura 7).

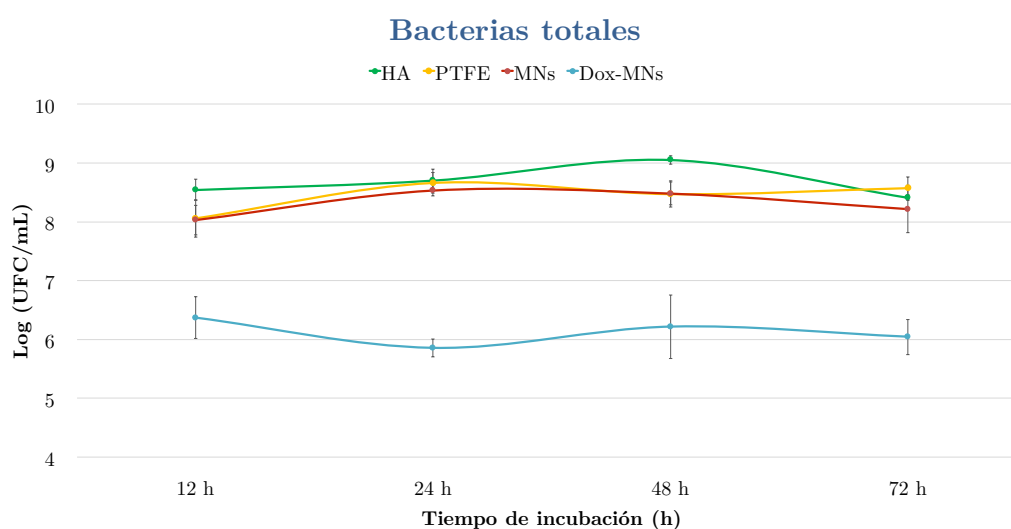


Figura 7.- Efecto de las membranas nanoestructuradas en el recuento de bacterias totales, medido por medio de la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real cuantitativa (qPCR). Los datos se expresan como logaritmo de las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL). HA, *biofilm* en discos de HA no recubiertos con membrana; PTFE, *biofilm* en discos de HA cubierto con una membrana comercial; MNs, *biofilm* en HA recubierto con membrana nanoestructurada activa sin cargar; Dox-MNs, *biofilm* en HA recubierto con MNs cargadas con doxiciclina; h, horas.

Para determinar el efecto de los diferentes materiales evaluados en la formación del *biofilm in vitro*, se realizó el test ANOVA, que mostró diferencias significativas entre los grupos a las 12, 24, 48 y 72 horas de incubación ($p=0,005$, $p=0,008$, $p=0,000$ y $p=0,033$ respectivamente). Los resultados de las correcciones de Bonferroni para comparaciones múltiples se muestran en las Tablas 3-6.

En las primeras 12 horas de incubación, la diferencia de medias de UFC/mL fue significativamente mayor en el grupo control de HA, donde se acumularon más bacterias, con respecto al resto de grupos ($p < 0,05$) (Tabla 3). En los discos Dox-MNs se observó menor acumulo de bacterias, pero sin diferencias significativas. Tras 24 horas de incubación, Dox-MNs acumularon significativamente menos bacterias que las mismas membranas sin cargar (MNs) ($p = 0,025$) y que los discos control de HA ($p = 0,011$) (Tabla 4). A las 48 horas, se observaron de nuevo diferencias significativas entre el control de HA y el resto de materiales evaluados ($p < 0,001$ en todos los casos). En los discos Dox-MNs se determinó un recuento menor de bacterias cuando se comparaba con los discos HA, con diferencias significativas ($p = 0,000$) (Tabla 5). Finalmente, a las 72 horas de incubación, en el *biofilm* maduro, se observó que los discos Dox-MNs acumularon significativamente menos bacterias que los discos con las mismas membranas, pero sin cargar (MNs) ($p = 0,034$) (Tabla 6).

Tabla 3. Efecto de los diferentes materiales en las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) para las bacterias totales a las 12 horas de incubación. Resultados test post-hoc Bonferroni.

Tratamiento		Diferencia de medias [UFC/mL (DE)]	P	IC 95%	
				Límite inferior	Límite superior
HA	MNs	$2,4 \times 10^9$ * ($6,9 \times 10^8$)	0.050	$2,7 \times 10^6$	$4,8 \times 10^9$
	PTFE	$2,4 \times 10^9$ * ($6,9 \times 10^8$)	0.048	$2,3 \times 10^7$	$4,8 \times 10^9$
	Dox-MNs	$3,7 \times 10^9$ * ($6,9 \times 10^8$)	0.004	$1,2 \times 10^9$	$6,1 \times 10^9$
MNs	HA	$-2,4 \times 10^9$ * ($6,9 \times 10^8$)	0.050	$-4,8 \times 10^9$	$-2,7 \times 10^6$
	PTFE	$2,1 \times 10^7$ ($6,9 \times 10^8$)	1.000	$-2,4 \times 10^9$	$2,4 \times 10^9$
	Dox-MNs	$1,2 \times 10^9$ ($6,9 \times 10^8$)	0.658	$-1,2 \times 10^9$	$3,6 \times 10^9$
PTFE	HA	$2,4 \times 10^9$ * ($6,9 \times 10^8$)	0.048	$-4,8 \times 10^9$	$-2,3 \times 10^7$
	MNs	$-2,1 \times 10^7$ ($6,9 \times 10^8$)	1.000	$-2,4 \times 10^9$	$2,4 \times 10^9$
	Dox-MNs	$1,2 \times 10^9$ ($6,9 \times 10^8$)	0.688	$-1,2 \times 10^9$	$3,6 \times 10^9$
Dox-MNs	HA	$-3,7 \times 10^9$ * ($6,9 \times 10^8$)	0.004	$-6,1 \times 10^9$	$-1,2 \times 10^9$
	MNs	$-1,2 \times 10^9$ ($6,9 \times 10^8$)	0.658	$-3,6 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$
	PTFE	$-1,2 \times 10^9$ ($6,9 \times 10^8$)	0.688	$-3,3 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$

* La diferencia de medias es significativa ($p < 0,05$). DE, Desviación estándar; IC, Intervalo de confianza; HA, *biofilm* en discos de hidroxipatita no recubiertos con membrana; MNs, *biofilm* en HA recubierto con membrana nanoestructurada activa sin cargar; Dox-MNs, *biofilm* en HA recubierto con MNs cargadas con doxiciclina; PTFE, *biofilm* en discos de HA cubierto con una membrana comercial.

Tabla 4. Efecto de los diferentes materiales en las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) para las bacterias totales a las 24 horas de incubación. Resultados test post-hoc Bonferroni.

Tratamiento		Diferencia de medias [UFC/mL (DE)]	p	IC 95%	
				Límite inferior	Límite superior
HA	MNs	$6,9 \times 10^8$ ($1,2 \times 10^9$)	1.000	$-3,4 \times 10^9$	$4,8 \times 10^9$
	PTFE	$1,7 \times 10^9$ ($1,2 \times 10^9$)	1.000	$-2,3 \times 10^9$	$5,8 \times 10^9$
	Dox-MNs	$5,4 \times 10^9$ * ($1,2 \times 10^9$)	0.011	$1,3 \times 10^9$	$9,5 \times 10^9$
MNs	HA	$-6,9 \times 10^8$ ($1,2 \times 10^9$)	1.000	$-4,8 \times 10^9$	$3,4 \times 10^9$
	PTFE	$1,1 \times 10^9$ ($1,2 \times 10^9$)	1.000	$-3,1 \times 10^9$	$5,8 \times 10^9$
	Dox-MNs	$4,6 \times 10^9$ * ($1,2 \times 10^9$)	0.025	$5,8 \times 10^8$	$8,8 \times 10^9$
PTFE	HA	$-1,7 \times 10^9$ ($1,2 \times 10^9$)	1.000	$-5,8 \times 10^9$	$2,3 \times 10^9$
	MNs	$-1,1 \times 10^7$ ($1,2 \times 10^9$)	1.000	$-5,2 \times 10^9$	$3,0 \times 10^9$
	Dox-MNs	$3,6 \times 10^9$ ($1,2 \times 10^9$)	0.094	$-5,0 \times 10^8$	$7,7 \times 10^9$
Dox-MNs	HA	$-5,4 \times 10^9$ * ($1,2 \times 10^9$)	0.011	$-9,5 \times 10^9$	$-1,3 \times 10^9$
	MNs	$-4,7 \times 10^9$ * ($1,2 \times 10^9$)	0.025	$-8,8 \times 10^9$	$-5,8 \times 10^9$
	PTFE	$-3,6 \times 10^9$ ($1,2 \times 10^9$)	0.094	$-7,7 \times 10^9$	$5,0 \times 10^9$

* La diferencia de medias es significativa ($p < 0,05$). DE, Desviación estándar; IC, Intervalo confianza; HA, *biofilm* en discos de hidroxiapatita no recubiertos con membrana; MNs, *biofilm* en HA recubierto con membrana nanoestructurada activa sin cargar; Dox-MNs, *biofilm* en HA recubierto con MNs cargadas con doxiciclina; PTFE, *biofilm* en discos de HA cubierto con una membrana comercial.

Tabla 5. Efecto de los diferentes materiales en las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) para las bacterias totales a las 48 horas de incubación. Resultados test post-hoc Bonferroni.

Tratamiento		Diferencia de medias [UFC/mL (DE)]	p	IC 95%	
				Límite inferior	Límite superior
HA	MNs	$8,2 \times 10^9$ * ($1,2 \times 10^9$)	0.001	$4,0 \times 10^9$	$1,2 \times 10^{10}$
	PTFE	$8,1 \times 10^9$ * ($1,2 \times 10^9$)	0.001	$3,4 \times 10^9$	$1,2 \times 10^{10}$
	Dox-MNs	$1,1 \times 10^{10}$ * ($1,2 \times 10^9$)	0.000	$7,2 \times 10^9$	$1,6 \times 10^{10}$
MNs	HA	$-8,2 \times 10^8$ * ($1,2 \times 10^9$)	0.001	$-1,2 \times 10^{10}$	$-4,0 \times 10^9$
	PTFE	$-1,6 \times 10^8$ ($1,2 \times 10^9$)	1.000	$-4,4 \times 10^9$	$4,0 \times 10^9$
	Dox-MNs	$3,1 \times 10^9$ ($1,2 \times 10^9$)	0.188	$-1,1 \times 10^9$	$7,3 \times 10^9$
PTFE	HA	$-8,1 \times 10^9$ * ($1,2 \times 10^9$)	0.001	$-1,2 \times 10^{10}$	$-3,9 \times 10^9$
	MNs	$1,6 \times 10^8$ ($1,2 \times 10^9$)	1.000	$-4,1 \times 10^9$	$4,4 \times 10^9$
	Dox-MNs	$3,3 \times 10^9$ ($1,2 \times 10^9$)	0.153	$-8,9 \times 10^8$	$7,5 \times 10^9$
Dox-MNs	HA	$-1,1 \times 10^{10}$ * ($1,2 \times 10^9$)	0.000	$-1,6 \times 10^{10}$	$-7,2 \times 10^9$
	MNs	$-3,1 \times 10^9$ ($1,2 \times 10^9$)	0.188	$-7,3 \times 10^9$	$1,1 \times 10^9$
	PTFE	$-3,3 \times 10^9$ ($1,2 \times 10^9$)	0.153	$-7,35 \times 10^9$	$8,9 \times 10^8$

* La diferencia de medias es significativa ($p < 0,05$). DE, Desviación estándar; IC, Intervalo confianza; HA, *biofilm* en discos de hidroxiapatita no recubiertos con membrana; MNs, *biofilm* en HA recubierto con membrana nanoestructurada activa sin cargar; Dox-MNs, *biofilm* en HA recubierto con MNs cargadas con doxiciclina; PTFE, *biofilm* en discos de HA cubierto con una membrana comercial.

Tabla 6. Efecto de los diferentes materiales en las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) para las bacterias totales a las 72 horas de incubación. Resultados test post-hoc Bonferroni.

Tratamiento		Diferencia de medias [UFC/mL (DE)]	P	IC 95%	
				Límite inferior	Límite superior
HA	MNs	$-2,1 \times 10^9$ ($1,2 \times 10^9$)	0.778	$-6,5 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$
	PTFE	$8,5 \times 10^8$ ($1,2 \times 10^9$)	1.000	$-3,5 \times 10^9$	$5,2 \times 10^9$
	Dox-MNs	$2,6 \times 10^9$ ($1,2 \times 10^9$)	0.447	$-1,8 \times 10^9$	$6,9 \times 10^9$
MNs	HA	$2,1 \times 10^9$ ($1,2 \times 10^9$)	0.778	$-2,2 \times 10^9$	$6,5 \times 10^9$
	PTFE	$2,9 \times 10^9$ ($1,2 \times 10^9$)	0.276	$1,4 \times 10^9$	$7,3 \times 10^9$
	Dox-MNs	$4,5 \times 10^9$ * ($1,2 \times 10^9$)	0.034	$3,3 \times 10^8$	$9,1 \times 10^9$
PTFE	HA	$-8,5 \times 10^8$ ($1,2 \times 10^9$)	1.000	$-5,2 \times 10^9$	$3,5 \times 10^9$
	MNs	$-2,9 \times 10^9$ ($1,2 \times 10^9$)	0.276	$-7,3 \times 10^9$	$1,4 \times 10^9$
	Dox-MNs	$1,7 \times 10^9$ ($1,2 \times 10^9$)	1.000	$-2,6 \times 10^9$	$6,1 \times 10^9$
Dox-MNs	HA	$-2,6 \times 10^9$ ($1,2 \times 10^9$)	0.447	$-6,9 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$
	MNs	$-4,7 \times 10^9$ * ($1,2 \times 10^9$)	0.034	$-9,1 \times 10^9$	$-3,3 \times 10^8$
	PTFE	$-1,7 \times 10^9$ ($1,2 \times 10^9$)	1.000	$-6,1 \times 10^9$	$2,6 \times 10^9$

* La diferencia de medias es significativa ($p < 0,05$). DE, Desviación estándar; IC, Intervalo confianza; HA, *biofilm* en discos de hidroxiapatita no recubiertos con membrana; MNs, *biofilm* en HA recubierto con membrana nanoestructurada activa sin cargar; Dox-MNs, *biofilm* en HA recubierto con MNs cargadas con doxiciclina; PTFE, *biofilm* en discos de HA cubierto con una membrana comercial.

5.2.2 Por especie bacteriana

Las Figuras 8 y 9 muestran los recuentos de las seis especies bacterianas, presentadas como Log (UFC/mL) e implicadas en los *biofilms* de los discos de HA recubiertos o no con las diferentes membranas, para cada tiempo de incubación. De manera general, se pudo observar cómo el recuento bacteriano fue siempre menor en el caso del grupo Dox-MNs. Las diferentes especies bacterianas inoculadas mostraron una dinámica similar a lo largo del tiempo, sin embargo, se observó un efecto diferente entre los materiales analizados.

Los resultados de la prueba de Shapiro-Wilk determinaron que la muestra siguió una distribución normal, por lo que la efectividad potencial de las MNs en el crecimiento del *biofilm* se evaluó según el número medio de bacterias.

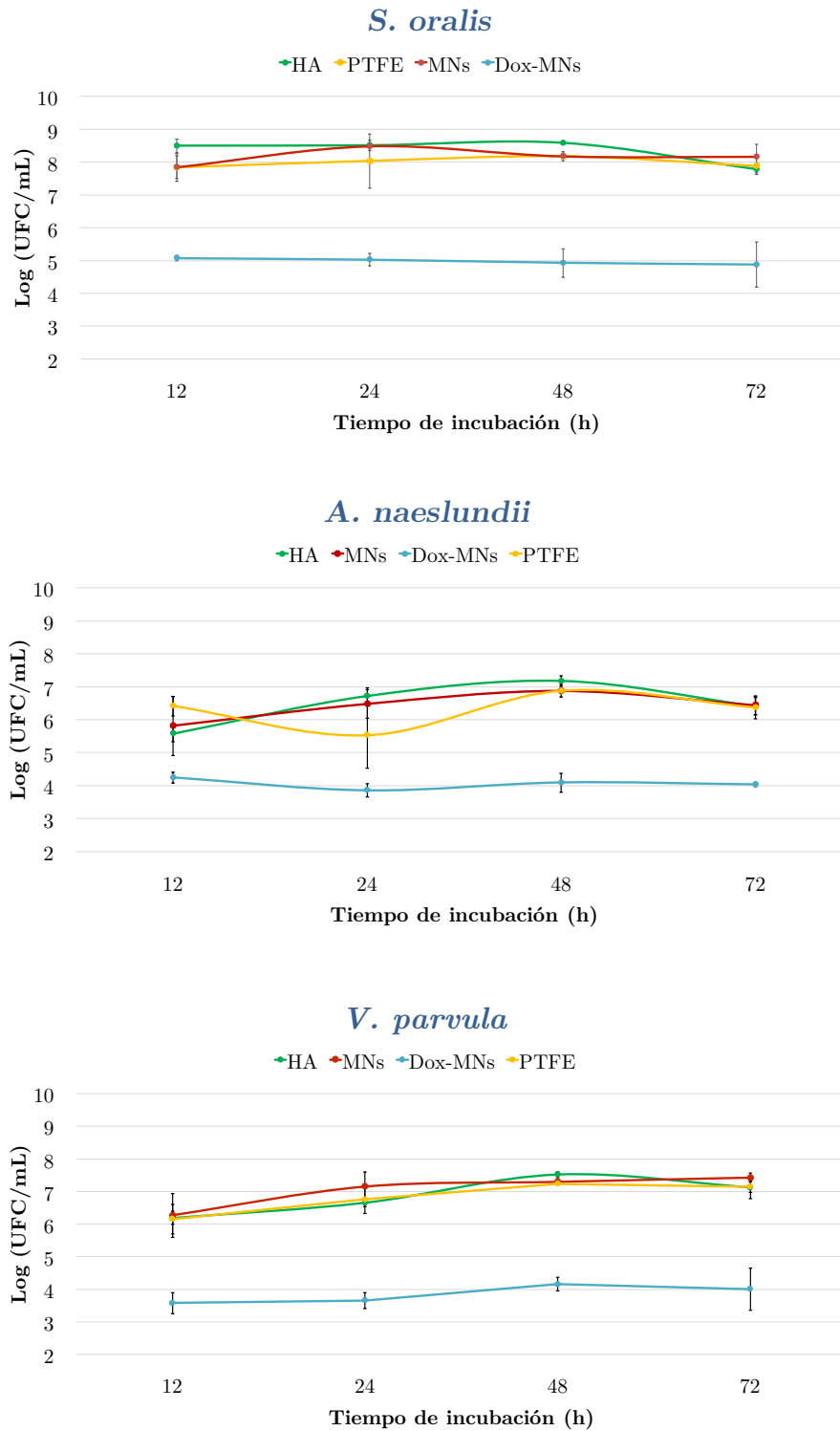


Figura 8.- Efecto de las membranas nanoestructuradas en el número medio de *S. oralis*, *A. naeslundii* y *V. parvula*, incluidos en el *biofilm* multi-especies *in vitro*, medido por medio de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR). Los datos se expresan como logaritmo de las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) (N = 3). HA, *biofilm* en discos de HA no recubiertos con membrana; MNs, *biofilm* en HA recubierto con membrana nanoestructurada activa sin cargar; Dox-MNs, *biofilm* en HA recubierto con MNs cargadas con doxiciclina; PTFE, *biofilm* en discos de HA cubierto con una membrana comercial; h, horas.

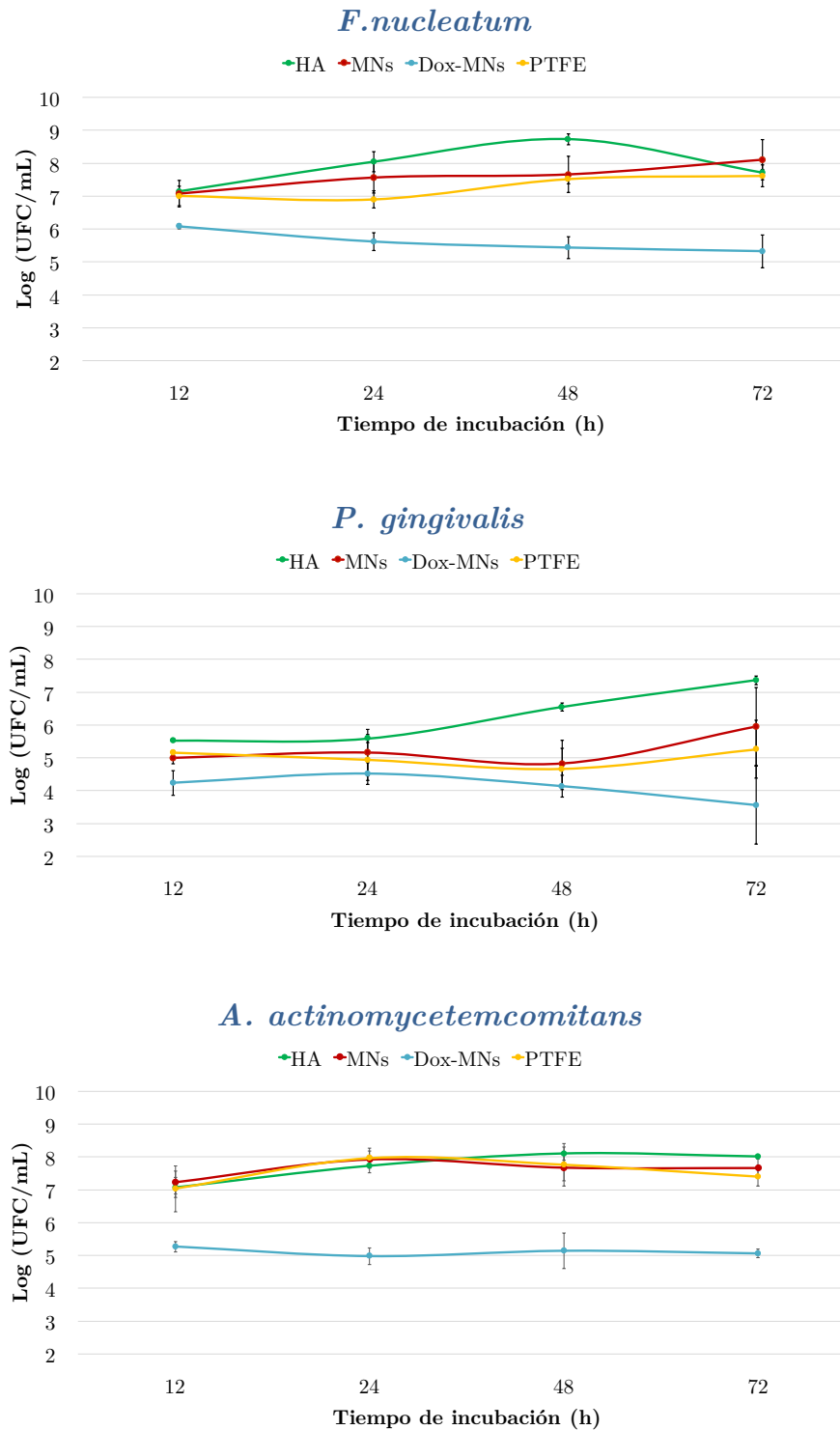


Figura 9.- Efecto de las membranas nanoestructuradas en el número medio de *F. nucleatum*, *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*, incluidos en el *biofilm* multi-especies *in vitro*, medido por medio de la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real cuantitativa (qPCR). Los datos se expresan como logaritmo de las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) (N = 3). HA, *biofilm* en discos de HA no recubiertos con membrana; MNs, *biofilm* en HA recubierto con membrana nanoestructurada activa sin cargar; Dox-MNs, *biofilm* en HA recubierto con MNs cargadas con doxiciclina; PTFE, *biofilm* en discos de HA cubierto con una membrana comercial; h, horas.

Tras 12 h de incubación, en las primeras etapas de evolución, los *biofilms* control en los discos de HA sin membrana o con PTFE acumularon un número similar de bacterias con respecto a los discos con MNs, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas (Tablas 7-12), a excepción de *S. oralis* que presentó significativamente una mayor proporción en los discos de HA sin membrana ($p=0,011$; $p=0,000$; $p=0,041$ con respecto a MNs, Dox-MNs y PTFE, respectivamente) (Tabla 7). Por otro lado, en Dox-MNs, y para las seis bacterias, se pudo detectar un número menor de UFC/mL en comparación con el resto de grupos (Figuras 8 y 9), con significación para *S. oralis* ($p<0,000$) (Tabla 7).

Después de 24 h de incubación, cuando los *biofilms* alcanzaron la fase exponencial de crecimiento, la situación fue similar, sin diferencias estadísticamente significativas entre los grupos HA, MNs y PTFE. Sin embargo, el recuento de bacterias fue menor en los discos con Dox-MNs, para las seis especies bacterianas, con diferentes estadísticamente significativas para *S. oralis* con respecto al *biofilm* control en HA ($p=0,000$) y las MNs sin cargar ($p=0,001$) (Tabla 7).

Durante las siguientes 48 horas de evolución, cuando los *biofilms* alcanzaron ya una fase estacionaria, las comunidades bacterianas en HA experimentaron un mayor crecimiento que MNs o PTFE, con diferencias significativas para *S. oralis*, *A. naeslundii* y *F. nucleatum* ($p<0,027$ en todos los casos) (Tablas 7, 8 y 10). Los discos Dox-MNs mostraron, para las seis bacterias, los valores más bajos de UFC/mL, con diferencias estadísticamente significativas para *S. oralis*, *V. parvula* y *F. nucleatum* con respecto al grupo HA y para *A. naeslundii* en comparación con el resto de muestras (HA, MNs y PTFE) ($p<0,015$ en todos los casos) (Tablas 7-10).

Después de 72 h de incubación, solo *S. oralis* redujo su presencia en los *biofilms* en discos HA tratados con las diferentes membranas. De nuevo, para los *biofilms* formados sobre discos con Dox-MNs, y para las seis bacterias, se pudo detectar un número menor de UFC/mL en comparación con el resto de grupos (Figuras 8 y 9), siendo estadísticamente significativo para *P. gingivalis* ($p=0,049$) y para *V. parvula* ($p=0,04$) (Tabla 9 y 11).

Tabla 7. Efecto de las MNs en el número medio de *S. oralis* medido por qPCR: modelo de regresión lineal general. Los resultados se expresan como diferencia de medias de las unidades formadoras de colonias (UFC/mL).

<i>S. oralis</i>			Diferencia de medias	P	IC 95% para diferencia	
			[UFC/mL (DE)]		Inferior	Superior
12h	HA	MNs	2,5 x 10 ⁹ * (7,0 x 10 ⁷)	0,011	3,6 x 10 ⁷	4,7 x 10 ⁸
		Dox-MNs	3,3 x 10 ⁹ * (7,0 x 10 ⁷)	0,000	1,2 x 10 ⁸	5,5 x 10 ⁸
		PTFE	2,5 x 10 ⁹ * (7,8 x 10 ⁷)	0,041	5,2 x 10 ⁶	4,9 x 10 ⁸
	MNs	HA	-2,5 x 10 ⁹ * (7,0 x 10 ⁷)	0,011	-4,7 x 10 ⁸	-3,6 x 10 ⁷
		Dox-MNs	8,6 x 10 ⁷ (7,0 x 10 ⁷)	1,000	-1,3 x 10 ⁸	3,0 x 10 ⁸
		PTFE	-5,6 x 10 ⁶ (7,8 x 10 ⁷)	1,000	-2,5 x 10 ⁸	2,4 x 10 ⁸
	Dox-MNs	HA	-3,3 x 10 ⁹ (7,0 x 10 ⁷)	0,000	-5,5 x 10 ⁸	-1, x 10 ⁸
		MNs	-8,6 x 10 ⁷ (7,0 x 10 ⁷)	1,000	-3,0 x 10 ⁸	1,3 x 10 ⁸
		PTFE	-9,1 x 10 ⁷ (7,8 x 10 ⁷)	1,000	-3,3 x 10 ⁸	1,5 x 10 ⁸
	PTFE	HA	-2,5 x 10 ⁹ * (7,8 x 10 ⁷)	0,041	-4,9 x 10 ⁸	-5,2 x 10 ⁶
		MNs	5,6 x 10 ⁶ (7,8 x 10 ⁷)	1,000	-2,4 x 10 ⁸	2,5 x 10 ⁸
		Dox-MNs	9,1 x 10 ⁷ (7,8 x 10 ⁷)	1,000	-1,5 x 10 ⁸	3,3 x 10 ⁸
24h	HA	MNs	3,8 x 10 ⁷ (7,0 x 10 ⁷)	1,000	-1,8 x 10 ⁸	2,5 x 10 ⁸
		Dox-MNs	3,3 x 10 ⁹ * (7,0 x 10 ⁷)	0,000	1,2 x 10 ⁸	5,5 x 10 ⁸
		PTFE	1,5 x 10 ⁸ (6,5 x 10 ⁷)	0,429	-5,4 x 10 ⁷	3,5 x 10 ⁸
	MNs	HA	-3,8 x 10 ⁷ (7,0 x 10 ⁷)	1,000	-2,5 x 10 ⁸	1,8 x 10 ⁸
		Dox-MNs	3 x 10 ⁹ * (7,0 x 10 ⁷)	0,001	8,5 x 10 ⁷	5,2 x 10 ⁸
		PTFE	1,1 x 10 ⁸ (6,5 x 10 ⁷)	1,000	-9,2 x 10 ⁷	3,1 x 10 ⁸
	Dox-MNs	HA	-3,3 x 10 ⁹ * (7,0 x 10 ⁷)	0,000	-5,5 x 10 ⁸	-1,2 x 10 ⁸
		MNs	-3 x 10 ⁹ * (7,0 x 10 ⁷)	0,001	-5,2 x 10 ⁸	-8,5 x 10 ⁷
		PTFE	-1,9 x 10 ⁸ (6,5 x 10 ⁷)	0,078	-3,9 x 10 ⁸	1,1 x 10 ⁷
	PTFE	HA	-1,5 x 10 ⁸ (6,5 x 10 ⁷)	0,429	-3,5 x 10 ⁸	5,4 x 10 ⁷
		MNs	-1,1 x 10 ⁸ (6,5 x 10 ⁷)	1,000	-3,1 x 10 ⁸	9,2 x 10 ⁷
		Dox-MNs	1,9 x 10 ⁸ (6,5 x 10 ⁷)	0,078	-1,1 x 10 ⁷	3,9 x 10 ⁸
48h	HA	MNs	2,3 x 10 ⁹ * (7,0 x 10 ⁷)	0,024	1,8 x 10 ⁷	4,5 x 10 ⁸
		Dox-MNs	3,8 x 10 ⁹ * (7,0 x 10 ⁷)	0,000	1,7 x 10 ⁸	6,0 x 10 ⁸
		PTFE	2,3 x 10 ⁹ * (7,0 x 10 ⁷)	0,027	1,5 x 10 ⁷	4,5 x 10 ⁸
	MNs	HA	-2,3 x 10 ⁹ * (7,0 x 10 ⁷)	0,024	-4,5 x 10 ⁸	-1,8 x 10 ⁷
		Dox-MNs	1,5 x 10 ⁸ (7,0 x 10 ⁷)	0,529	-6,5 x 10 ⁷	3,7 x 10 ⁸
		PTFE	-2,9 x 10 ⁶ (7,0 x 10 ⁷)	1,000	-2,2 x 10 ⁸	2,1 x 10 ⁸
	Dox-MNs	HA	-3,8 x 10 ⁹ * (7,0 x 10 ⁷)	0,000	-6,0 x 10 ⁸	-1,7 x 10 ⁸
		MNs	-1,5 x 10 ⁸ (7,0 x 10 ⁷)	0,529	-3,7 x 10 ⁸	6,5 x 10 ⁷
		PTFE	-1,5 x 10 ⁸ (7,0 x 10 ⁷)	0,480	-3,7 x 10 ⁸	6,2 x 10 ⁷
	PTFE	HA	-2,3 x 10 ⁹ * (7,0 x 10 ⁷)	0,027	-4,5 x 10 ⁸	-1,5 x 10 ⁷
		MNs	2,9 x 10 ⁶ (7,0 x 10 ⁷)	1,000	-2,1 x 10 ⁸	2,2 x 10 ⁸
		Dox-MNs	1,5 x 10 ⁸ (7,0 x 10 ⁷)	0,480	-6,2 x 10 ⁷	3,7 x 10 ⁸
72h	HA	MNs	-1,2 x 10 ⁸ (7,0 x 10 ⁷)	1,000	-3,4 x 10 ⁸	9,7 x 10 ⁷
		Dox-MNs	6,1 x 10 ⁷ (7,0 x 10 ⁷)	1,000	-1,5 x 10 ⁸	2,8 x 10 ⁸
		PTFE	-3,7 x 10 ⁷ (7,8 x 10 ⁷)	1,000	-2,8 x 10 ⁸	2,0 x 10 ⁸
	MNs	HA	1,2 x 10 ⁸ (7,0 x 10 ⁷)	1,000	-9,7 x 10 ⁷	3,4 x 10 ⁸
		Dox-MNs	1,8 x 10 ⁸ (7,0 x 10 ⁷)	0,194	-3,6 x 10 ⁷	4,0 x 10 ⁸
		PTFE	8,2 x 10 ⁷ (7,8 x 10 ⁷)	1,000	-1,6 x 10 ⁸	3,2 x 10 ⁸
	Dox-MNs	HA	-6,1 x 10 ⁷ (7,0 x 10 ⁷)	1,000	-2,8 x 10 ⁸	1,5 x 10 ⁸
		MNs	-1,8 x 10 ⁸ (7,0 x 10 ⁷)	0,194	-4,0 x 10 ⁸	3,6 x 10 ⁷
		PTFE	-9,8 x 10 ⁷ (7,8 x 10 ⁷)	1,000	-3,4 x 10 ⁸	1,4 x 10 ⁸
	PTFE	HA	3,7 x 10 ⁷ (7,8 x 10 ⁷)	1,000	-2,0 x 10 ⁸	2,8 x 10 ⁸
		MNs	-8,2 x 10 (7,8 x 10 ⁷)	1,000	-3,2 x 10 ⁸	1,6 x 10 ⁸
		Dox-MNs	9,8 x 10 ⁷ (7,8 x 10 ⁷)	1,000	-1,4 x 10 ⁸	3,4 x 10 ⁸

* La diferencia de medias es significativa (p<0,05), DE, Desviación estándar; IC, Intervalo de confianza; HA, *biofilm* en discos de hidroxiapatita no recubiertos con membrana; MNs, *biofilm* en HA recubierto con membrana nanoestructurada activa sin cargar; Dox-MNs, *biofilm* en HA recubierto con MNs cargadas con doxiciclina; PTFE, *biofilm* en discos de HA cubierto con una membrana comercial.

Tabla 8. Efecto de las MNs en el número medio de *A. naeslundii* medido por qPCR: modelo de regresión lineal general. Los resultados se expresan como diferencia de medias de las unidades formadoras de colonias (UFC/mL).

<i>A. naeslundii</i>		Diferencia de medias [UFC/mL (DE)]	P	IC 95% para diferencia		
				Inferior	Superior	
12h	HA	MNs	-1,2 x 10 ⁶ (2,1 x 10 ⁶)	0,011	3,6 x 10 ⁷	4,7 x 10 ⁸
		Dox-MNs	4,0 x 10 ⁵ (2,1 x 10 ⁶)	0,000	1,2 x 10 ⁸	5,5 x 10 ⁸
		PTFE	-1,7 x 10 ⁶ (2,4 x 10 ⁶)	0,041	5,2 x 10 ⁶	4,9 x 10 ⁸
	MNs	HA	1,2 x 10 ⁶ (2,1 x 10 ⁶)	0,011	-4,7 x 10 ⁸	-3,6 x 10 ⁷
		Dox-MNs	1,6 x 10 ⁶ (2,1 x 10 ⁶)	1,000	-1,3 x 10 ⁸	3,0 x 10 ⁸
		PTFE	-5,5 x 10 ⁵ (2,4 x 10 ⁶)	1,000	-2,5 x 10 ⁸	2,4 x 10 ⁸
	Dox-MNs	HA	-4,0 x 10 ⁵ (2,1 x 10 ⁶)	0,000	-5,5 x 10 ⁸	-1, x 10 ⁸
		MNs	-1,6 x 10 ⁶ (2,1 x 10 ⁶)	1,000	-3,0 x 10 ⁸	1,3 x 10 ⁸
		PTFE	-2,1 x 10 ⁶ (2,4 x 10 ⁶)	1,000	-3,3 x 10 ⁸	1,5 x 10 ⁸
	PTFE	HA	1,7 x 10 ⁶ (2,4 x 10 ⁶)	0,041	-4,9 x 10 ⁸	-5,2 x 10 ⁶
		MNs	5,5 x 10 ⁵ (2,4 x 10 ⁶)	1,000	-2,4 x 10 ⁸	2,5 x 10 ⁸
		Dox-MNs	2,1 x 10 ⁶ (2,4 x 10 ⁶)	1,000	-1,5 x 10 ⁸	3,3 x 10 ⁸
24h	HA	MNs	1,4 x 10 ⁶ (2,1 x 10 ⁶)	1,000	-1,8 x 10 ⁸	2,5 x 10 ⁸
		Dox-MNs	5,8 x 10 ⁶ (2,1 x 10 ⁶)	0,000	1,2 x 10 ⁸	5,5 x 10 ⁸
		PTFE	4,7 x 10 ⁶ (2,0 x 10 ⁶)	0,429	-5,4 x 10 ⁷	3,5 x 10 ⁸
	MNs	HA	-1,4 x 10 ⁶ (2,1 x 10 ⁶)	1,000	-2,5 x 10 ⁸	1,8 x 10 ⁸
		Dox-MNs	4,3 x 10 ⁶ (2,1 x 10 ⁶)	0,001	8,5 x 10 ⁷	5,2 x 10 ⁸
		PTFE	3,3 x 10 ⁶ (2,0 x 10 ⁶)	1,000	-9,2 x 10 ⁷	3,1 x 10 ⁸
	Dox-MNs	HA	-5,8 x 10 ⁶ (2,1 x 10 ⁶)	0,000	-5,5 x 10 ⁸	-1,2 x 10 ⁸
		MNs	-4,3 x 10 ⁶ (2,1 x 10 ⁶)	0,001	-5,2 x 10 ⁸	-8,5 x 10 ⁷
		PTFE	-1,0 x 10 ⁶ (2,0 x 10 ⁶)	0,078	-3,9 x 10 ⁸	1,1 x 10 ⁷
	PTFE	HA	-4,7 x 10 ⁶ (2,0 x 10 ⁶)	0,429	-3,5 x 10 ⁸	5,4 x 10 ⁷
		MNs	-3,3 x 10 ⁶ (2,0 x 10 ⁶)	1,000	-3,1 x 10 ⁸	9,2 x 10 ⁷
		Dox-MNs	1,0 x 10 ⁶ (2,0 x 10 ⁶)	0,078	-1,1 x 10 ⁷	3,9 x 10 ⁸
48h	HA	MNs	7,3 x 10 ⁷ * (2,1 x 10 ⁶)	0,024	1,8 x 10 ⁷	4,5 x 10 ⁸
		Dox-MNs	1,5 x 10 ⁸ * (2,1 x 10 ⁶)	0,000	1,7 x 10 ⁸	6,0 x 10 ⁸
		PTFE	7,8 x 10 ⁷ * (2,1 x 10 ⁶)	0,027	1,5 x 10 ⁷	4,5 x 10 ⁸
	MNs	HA	-7,3 x 10 ⁷ * (2,1 x 10 ⁶)	0,024	-4,5 x 10 ⁸	-1,8 x 10 ⁷
		Dox-MNs	8 x 10 ⁷ * (2,1 x 10 ⁶)	0,529	-6,5 x 10 ⁷	3,7 x 10 ⁸
		PTFE	5,0 x 10 ⁵ (2,1 x 10 ⁶)	1,000	-2,2 x 10 ⁸	2,1 x 10 ⁸
	Dox-MNs	HA	-1,5 x 10 ⁸ * (2,1 x 10 ⁶)	0,000	-6,0 x 10 ⁸	-1,7 x 10 ⁸
		MNs	-8 x 10 ⁷ * (2,1 x 10 ⁶)	0,529	-3,7 x 10 ⁸	6,5 x 10 ⁷
		PTFE	-7,5 x 10 ⁷ * (2,1 x 10 ⁶)	0,480	-3,7 x 10 ⁸	6,2 x 10 ⁷
	PTFE	HA	-7,8 x 10 ⁷ * (2,1 x 10 ⁶)	0,027	-4,5 x 10 ⁸	-1,5 x 10 ⁷
		MNs	-5,0 x 10 ⁵ (2,1 x 10 ⁶)	1,000	-2,1 x 10 ⁸	2,2 x 10 ⁸
		Dox-MNs	7,5 x 10 ⁷ * (2,1 x 10 ⁶)	0,480	-6,2 x 10 ⁷	3,7 x 10 ⁸
72h	HA	MNs	-3,0 x 10 ⁵ (2,1 x 10 ⁶)	1,000	-3,4 x 10 ⁸	9,7 x 10 ⁷
		Dox-MNs	2,9 x 10 ⁶ (2,1 x 10 ⁶)	1,000	-1,5 x 10 ⁸	2,8 x 10 ⁸
		PTFE	-3,0 x 10 ⁵ (2,4 x 10 ⁶)	1,000	-2,8 x 10 ⁸	2,0 x 10 ⁸
	MNs	HA	3,0 x 10 ⁵ (2,1 x 10 ⁶)	1,000	-9,7 x 10 ⁷	3,4 x 10 ⁸
		Dox-MNs	3,2 x 10 ⁶ (2,1 x 10 ⁶)	0,194	-3,6 x 10 ⁷	4,0 x 10 ⁸
		PTFE	6,7 x 10 ³ (2,4 x 10 ⁶)	1,000	-1,6 x 10 ⁸	3,2 x 10 ⁸
	Dox-MNs	HA	-2,9 x 10 ⁶ (2,1 x 10 ⁶)	1,000	-2,8 x 10 ⁸	1,5 x 10 ⁸
		MNs	-3,2 x 10 ⁶ (2,1 x 10 ⁶)	0,194	-4,0 x 10 ⁸	3,6 x 10 ⁷
		PTFE	-3,2 x 10 ⁶ (2,4 x 10 ⁶)	1,000	-3,4 x 10 ⁸	1,4 x 10 ⁸
	PTFE	HA	3,0 x 10 ⁵ (2,4 x 10 ⁶)	1,000	-2,0 x 10 ⁸	2,8 x 10 ⁸
		MNs	-6,7 x 10 ³ (2,4 x 10 ⁶)	1,000	-3,2 x 10 ⁸	1,6 x 10 ⁸
		Dox-MNs	3,2 x 10 ⁶ (2,4 x 10 ⁶)	1,000	-1,4 x 10 ⁸	3,4 x 10 ⁸

* La diferencia de medias es significativa (p<0,05), DE, Desviación estándar; IC, Intervalo de confianza; HA, *biofilm* en discos de hidroxiapatita no recubiertos con membrana; MNs, *biofilm* en HA recubierto con membrana nanoestructurada activa sin cargar; Dox-MNs, *biofilm* en HA recubierto con MNs cargadas con doxiciclina; PTFE, *biofilm* en discos de HA cubierto con una membrana comercial.

Tabla 9. Efecto de las MNs en el número medio de *V. parvula* medido por qPCR: modelo de regresión lineal general. Los resultados se expresan como diferencia de medias de las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL).

<i>V. parvula</i>			Diferencia de medias [UFC/mL (DE)]	p	IC 95% para diferencia	
					Inferior	Superior
12h	HA	MNs	$-1,5 \times 10^6$ ($7,1 \times 10^6$)	0,011	$3,6 \times 10^7$	$4,7 \times 10^8$
		Dox-MNs	$1,6 \times 10^6$ ($7,1 \times 10^6$)	0,000	$1,2 \times 10^8$	$5,5 \times 10^8$
		PTFE	$-1,1 \times 10^6$ ($7,9 \times 10^6$)	0,041	$5,2 \times 10^6$	$4,9 \times 10^8$
	MNs	HA	$1,5 \times 10^6$ ($7,1 \times 10^6$)	0,011	$-4,7 \times 10^8$	$-3,6 \times 10^7$
		Dox-MNs	$3,2 \times 10^6$ ($7,1 \times 10^6$)	1,000	$-1,3 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$
		PTFE	$3,7 \times 10^6$ ($7,9 \times 10^6$)	1,000	$-2,5 \times 10^8$	$2,4 \times 10^8$
	Dox-MNs	HA	-16×10^6 ($7,1 \times 10^6$)	0,000	$-5,5 \times 10^8$	$-1, \times 10^8$
		MNs	$-3,2 \times 10^6$ ($7,1 \times 10^6$)	1,000	$-3,0 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$
		PTFE	$-2,8 \times 10^6$ ($7,9 \times 10^6$)	1,000	$-3,3 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$
	PTFE	HA	$1,1 \times 10^6$ ($7,9 \times 10^6$)	0,041	$-4,9 \times 10^8$	$-5,2 \times 10^6$
		MNs	$-3,7 \times 10^5$ ($7,9 \times 10^6$)	1,000	$-2,4 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$
		Dox-MNs	$2,8 \times 10^6$ ($7,9 \times 10^6$)	1,000	$-1,5 \times 10^8$	$3,3 \times 10^8$
24h	HA	MNs	$-1,5 \times 10^7$ ($7,1 \times 10^6$)	1,000	$-1,8 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$
		Dox-MNs	$4,6 \times 10^6$ ($7,1 \times 10^6$)	0,000	$1,2 \times 10^8$	$5,5 \times 10^8$
		PTFE	$-1,3 \times 10^6$ ($6,6 \times 10^6$)	0,429	$-5,4 \times 10^7$	$3,5 \times 10^8$
	MNs	HA	$1,5 \times 10^7$ ($7,1 \times 10^6$)	1,000	$-2,5 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$
		Dox-MNs	$2,0 \times 10^7$ ($7,1 \times 10^6$)	0,001	$8,5 \times 10^7$	$5,2 \times 10^8$
		PTFE	$1,4 \times 10^7$ ($6,6 \times 10^6$)	1,000	$-9,2 \times 10^7$	$3,1 \times 10^8$
	Dox-MNs	HA	$-4,6 \times 10^6$ ($7,1 \times 10^6$)	0,000	$-5,5 \times 10^8$	$-1,2 \times 10^8$
		MNs	$-2,0 \times 10^7$ ($7,1 \times 10^6$)	0,001	$-5,2 \times 10^8$	$-8,5 \times 10^7$
		PTFE	$-5,9 \times 10^6$ ($6,6 \times 10^6$)	0,078	$-3,9 \times 10^8$	$1,1 \times 10^7$
	PTFE	HA	$1,3 \times 10^6$ ($6,6 \times 10^6$)	0,429	$-3,5 \times 10^8$	$5,4 \times 10^7$
		MNs	$-1,4 \times 10^7$ ($6,6 \times 10^6$)	1,000	$-3,1 \times 10^8$	$9,2 \times 10^7$
		Dox-MNs	$5,9 \times 10^6$ ($6,6 \times 10^6$)	0,078	$-1,1 \times 10^7$	$3,9 \times 10^8$
48h	HA	MNs	$1,3 \times 10^7$ ($7,1 \times 10^6$)	0,024	$1,8 \times 10^7$	$4,5 \times 10^8$
		Dox-MNs	$3,2 \times 10^8$ * ($7,1 \times 10^6$)	0,000	$1,7 \times 10^8$	$6,0 \times 10^8$
		PTFE	$1,6 \times 10^7$ ($7,1 \times 10^6$)	0,027	$1,5 \times 10^7$	$4,5 \times 10^8$
	MNs	HA	$-1,3 \times 10^7$ ($7,1 \times 10^6$)	0,024	$-4,5 \times 10^8$	$-1,8 \times 10^7$
		Dox-MNs	$2,0 \times 10^7$ ($7,1 \times 10^6$)	0,529	$-6,5 \times 10^7$	$3,7 \times 10^8$
		PTFE	$2,9 \times 10^6$ ($7,1 \times 10^6$)	1,000	$-2,2 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$
	Dox-MNs	HA	$-3,2 \times 10^8$ * ($7,1 \times 10^6$)	0,000	$-6,0 \times 10^8$	$-1,7 \times 10^8$
		MNs	$-2,0 \times 10^7$ ($7,1 \times 10^6$)	0,529	$-3,7 \times 10^8$	$6,5 \times 10^7$
		PTFE	$-1,7 \times 10^7$ ($7,1 \times 10^6$)	0,480	$-3,7 \times 10^8$	$6,2 \times 10^7$
	PTFE	HA	$-1,6 \times 10^7$ ($7,1 \times 10^6$)	0,027	$-4,5 \times 10^8$	$-1,5 \times 10^7$
		MNs	$-2,9 \times 10^6$ ($7,1 \times 10^6$)	1,000	$-2,1 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$
		Dox-MNs	$1,7 \times 10^7$ ($7,1 \times 10^6$)	0,480	$-6,2 \times 10^7$	$3,7 \times 10^8$
72h	HA	MNs	$-1,2 \times 10^7$ ($7,1 \times 10^6$)	1,000	$-3,4 \times 10^8$	$9,7 \times 10^7$
		Dox-MNs	$1,6 \times 10^7$ ($7,1 \times 10^6$)	1,000	$-1,5 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$
		PTFE	$4,9 \times 10^6$ ($7,9 \times 10^6$)	1,000	$-2,8 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$
	MNs	HA	$1,2 \times 10^7$ ($7,1 \times 10^6$)	1,000	$-9,7 \times 10^7$	$3,4 \times 10^8$
		Dox-MNs	$2,7 \times 10^8$ * ($7,1 \times 10^6$)	0,194	$-3,6 \times 10^7$	$4,0 \times 10^8$
		PTFE	$1,6 \times 10^7$ ($7,9 \times 10^6$)	1,000	$-1,6 \times 10^8$	$3,2 \times 10^8$
	Dox-MNs	HA	$-1,6 \times 10^7$ ($7,1 \times 10^6$)	1,000	$-2,8 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$
		MNs	$-2,7 \times 10^8$ * ($7,1 \times 10^6$)	0,194	$-4,0 \times 10^8$	$3,6 \times 10^7$
		PTFE	$-1,1 \times 10^7$ ($7,9 \times 10^6$)	1,000	$-3,4 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$
	PTFE	HA	$-4,9 \times 10^6$ ($7,9 \times 10^6$)	1,000	$-2,0 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$
		MNs	$-1,6 \times 10^7$ ($7,9 \times 10^6$)	1,000	$-3,2 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$
		Dox-MNs	$1,1 \times 10^7$ ($7,9 \times 10^6$)	1,000	$-1,4 \times 10^8$	$3,4 \times 10^8$

* La diferencia de medias es significativa ($p < 0,05$). DE, Desviación estándar; IC, Intervalo de confianza; HA, *biofilm* en discos de hidroxapatita no recubiertos con membrana; MNs, *biofilm* en HA recubierto con membrana nanoestructurada activa sin cargar; Dox-MNs, *biofilm* en HA recubierto con MNs cargadas con doxiciclina; PTFE, *biofilm* en discos de HA cubierto con una membrana comercial.

Tabla 10. Efecto de las MNs en el número medio de *F. nucleatum* medido por qPCR: modelo de regresión lineal general. Los resultados se expresan como diferencia de medias de las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL).

<i>F. nucleatum</i>			Diferencia de medias [UFC/mL (DE)]	p	IC 95% para diferencia	
					Inferior	Superior
12h	HA	MNs	$-1,2 \times 10^6$ ($7,4 \times 10^7$)	0,011	$3,6 \times 10^7$	$4,7 \times 10^8$
		Dox-MNs	$1,3 \times 10^7$ ($7,4 \times 10^7$)	0,000	$1,2 \times 10^8$	$5,5 \times 10^8$
		PTFE	$-1,2 \times 10^6$ ($8,3 \times 10^7$)	0,041	$5,2 \times 10^6$	$4,9 \times 10^8$
	MNs	HA	$1,2 \times 10^6$ ($7,4 \times 10^7$)	0,011	$-4,7 \times 10^8$	$-3,6 \times 10^7$
		Dox-MNs	$1,4 \times 10^7$ ($7,4 \times 10^7$)	1,000	$-1,3 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$
		PTFE	$-6,5 \times 10^4$ ($8,3 \times 10^7$)	1,000	$-2,5 \times 10^8$	$2,4 \times 10^8$
	Dox-MNs	HA	$-1,3 \times 10^7$ ($7,4 \times 10^7$)	0,000	$-5,5 \times 10^8$	$-1, \times 10^8$
		MNs	$-1,4 \times 10^7$ ($7,4 \times 10^7$)	1,000	$-3,0 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$
		PTFE	$-1,4 \times 10^7$ ($8,3 \times 10^7$)	1,000	$-3,3 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$
	PTFE	HA	$1,2 \times 10^6$ ($8,3 \times 10^7$)	0,041	$-4,9 \times 10^8$	$-5,2 \times 10^6$
		MNs	$6,5 \times 10^4$ ($8,3 \times 10^7$)	1,000	$-2,4 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$
		Dox-MNs	$1,4 \times 10^7$ ($8,3 \times 10^7$)	1,000	$-1,5 \times 10^8$	$3,3 \times 10^8$
24h	HA	MNs	$7,9 \times 10^7$ ($7,4 \times 10^7$)	1,000	$-1,8 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$
		Dox-MNs	$1,3 \times 10^8$ ($7,4 \times 10^7$)	0,000	$1,2 \times 10^8$	$5,5 \times 10^8$
		PTFE	$1,2 \times 10^8$ ($6,9 \times 10^7$)	0,429	$-5,4 \times 10^7$	$3,5 \times 10^8$
	MNs	HA	$-7,9 \times 10^7$ ($7,4 \times 10^7$)	1,000	$-2,5 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$
		Dox-MNs	$5,0 \times 10^7$ ($7,4 \times 10^7$)	0,001	$8,5 \times 10^7$	$5,2 \times 10^8$
		PTFE	$4,2 \times 10^7$ ($6,9 \times 10^7$)	1,000	$-9,2 \times 10^7$	$3,1 \times 10^8$
	Dox-MNs	HA	$-1,3 \times 10^8$ ($7,4 \times 10^7$)	0,000	$-5,5 \times 10^8$	$-1,2 \times 10^8$
		MNs	$-5,0 \times 10^7$ ($7,4 \times 10^7$)	0,001	$-5,2 \times 10^8$	$-8,5 \times 10^7$
		PTFE	$-7,5 \times 10^8$ ($6,9 \times 10^7$)	0,078	$-3,9 \times 10^8$	$1,1 \times 10^7$
	PTFE	HA	$-1,2 \times 10^8$ ($6,9 \times 10^7$)	0,429	$-3,5 \times 10^8$	$5,4 \times 10^7$
		MNs	$-4,2 \times 10^7$ ($6,9 \times 10^7$)	1,000	$-3,1 \times 10^8$	$9,2 \times 10^7$
		Dox-MNs	$7,5 \times 10^6$ ($6,9 \times 10^7$)	0,078	$-1,1 \times 10^7$	$3,9 \times 10^8$
48h	HA	MNs	$4,9 \times 10^9$ * ($7,4 \times 10^7$)	0,024	$1,8 \times 10^7$	$4,5 \times 10^8$
		Dox-MNs	$5,7 \times 10^9$ * ($7,4 \times 10^7$)	0,000	$1,7 \times 10^8$	$6,0 \times 10^8$
		PTFE	$5,3 \times 10^9$ * ($7,4 \times 10^7$)	0,027	$1,5 \times 10^7$	$4,5 \times 10^8$
	MNs	HA	$-4,9 \times 10^9$ * ($7,4 \times 10^7$)	0,024	$-4,5 \times 10^8$	$-1,8 \times 10^7$
		Dox-MNs	$7,9 \times 10^7$ ($7,4 \times 10^7$)	0,529	$-6,5 \times 10^7$	$3,7 \times 10^8$
		PTFE	$4,5 \times 10^7$ ($7,4 \times 10^7$)	1,000	$-2,2 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$
	Dox-MNs	HA	$-5,7 \times 10^9$ * ($7,4 \times 10^7$)	0,000	$-6,0 \times 10^8$	$-1,7 \times 10^8$
		MNs	$-7,9 \times 10^7$ ($7,4 \times 10^7$)	0,529	$-3,7 \times 10^8$	$6,5 \times 10^7$
		PTFE	$-3,4 \times 10^7$ ($7,4 \times 10^7$)	0,480	$-3,7 \times 10^8$	$6,2 \times 10^7$
	PTFE	HA	$-5,3 \times 10^9$ * ($7,4 \times 10^7$)	0,027	$-4,5 \times 10^8$	$-1,5 \times 10^7$
		MNs	$-4,5 \times 10^7$ ($7,4 \times 10^7$)	1,000	$-2,1 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$
		Dox-MNs	$3,4 \times 10^7$ ($7,4 \times 10^7$)	0,480	$-6,2 \times 10^7$	$3,7 \times 10^8$
72h	HA	MNs	$-1,5 \times 10^8$ ($7,4 \times 10^7$)	1,000	$-3,4 \times 10^8$	$9,7 \times 10^7$
		Dox-MNs	$5,2 \times 10^7$ ($7,4 \times 10^7$)	1,000	$-1,5 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$
		PTFE	$-1,2 \times 10^7$ ($8,3 \times 10^7$)	1,000	$-2,8 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$
	MNs	HA	$1,5 \times 10^8$ ($7,4 \times 10^7$)	1,000	$-9,7 \times 10^7$	$3,4 \times 10^8$
		Dox-MNs	$2,0 \times 10^8$ ($7,4 \times 10^7$)	0,194	$-3,6 \times 10^7$	$4,0 \times 10^8$
		PTFE	$1,4 \times 10^8$ ($8,3 \times 10^7$)	1,000	$-1,6 \times 10^8$	$3,2 \times 10^8$
	Dox-MNs	HA	$-5,2 \times 10^7$ ($7,4 \times 10^7$)	1,000	$-2,8 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$
		MNs	$-2,0 \times 10^8$ ($7,4 \times 10^7$)	0,194	$-4,0 \times 10^8$	$3,6 \times 10^7$
		PTFE	$-6,4 \times 10^7$ ($8,3 \times 10^7$)	1,000	$-3,4 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$
	PTFE	HA	$1,2 \times 10^7$ ($8,3 \times 10^7$)	1,000	$-2,0 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$
		MNs	$-1,4 \times 10^8$ ($8,3 \times 10^7$)	1,000	$-3,2 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$
		Dox-MNs	$6,4 \times 10^7$ ($8,3 \times 10^7$)	1,000	$-1,4 \times 10^8$	$3,4 \times 10^8$

* La diferencia de medias es significativa ($p < 0,05$). DE, Desviación estándar; IC, Intervalo de confianza; HA, *biofilm* en discos de hidroxiapatita no recubiertos con membrana; MNs, *biofilm* en HA recubierto con membrana nanoestructurada activa sin cargar; Dox-MNs, *biofilm* en HA recubierto con MNs cargadas con doxiciclina; PTFE, *biofilm* en discos de HA cubierto con una membrana comercial.

Tabla 11. Efecto de las MNs en el número medio de *P. gingivalis* medido por qPCR: modelo de regresión lineal general. Los resultados se expresan como diferencia de medias de las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL).

<i>F. nucleatum</i>			Diferencia de medias [UFC/mL (DE)]	p	IC 95% para diferencia	
					Inferior	Superior
12h	HA	MNs	$2,4 \times 10^5$ ($7,6 \times 10^6$)	0,011	$3,6 \times 10^7$	$4,7 \times 10^8$
		Dox-MNs	$3,1 \times 10^5$ ($7,6 \times 10^6$)	0,000	$1,2 \times 10^8$	$5,5 \times 10^8$
		PTFE	$1,8 \times 10^5$ ($8,5 \times 10^6$)	0,041	$5,2 \times 10^6$	$4,9 \times 10^8$
	MNs	HA	$-2,4 \times 10^5$ ($7,6 \times 10^6$)	0,011	$-4,7 \times 10^8$	$-3,6 \times 10^7$
		Dox-MNs	$7,3 \times 10^4$ ($7,6 \times 10^6$)	1,000	$-1,3 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$
		PTFE	$-5,5 \times 10^4$ ($8,5 \times 10^6$)	1,000	$-2,5 \times 10^8$	$2,4 \times 10^8$
	Dox-MNs	HA	$-3,1 \times 10^5$ ($7,6 \times 10^6$)	0,000	$-5,5 \times 10^8$	$-1, \times 10^8$
		MNs	$-7,3 \times 10^4$ ($7,6 \times 10^6$)	1,000	$-3,0 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$
		PTFE	$-1,3 \times 10^5$ ($8,5 \times 10^6$)	1,000	$-3,3 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$
	PTFE	HA	$-1,8 \times 10^5$ ($8,5 \times 10^6$)	0,041	$-4,9 \times 10^8$	$-5,2 \times 10^6$
		MNs	$5,5 \times 10^4$ ($8,5 \times 10^6$)	1,000	$-2,4 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$
		Dox-MNs	$1,3 \times 10^5$ ($8,5 \times 10^6$)	1,000	$-1,5 \times 10^8$	$3,3 \times 10^8$
24h	HA	MNs	$2,4 \times 10^5$ ($7,6 \times 10^6$)	1,000	$-1,8 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$
		Dox-MNs	$3,5 \times 10^5$ ($7,6 \times 10^6$)	0,000	$1,2 \times 10^8$	$5,5 \times 10^8$
		PTFE	$2,9 \times 10^5$ ($7,1 \times 10^6$)	0,429	$-5,4 \times 10^7$	$3,5 \times 10^8$
	MNs	HA	$-2,4 \times 10^5$ ($7,6 \times 10^6$)	1,000	$-2,5 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$
		Dox-MNs	$1,1 \times 10^5$ ($7,6 \times 10^6$)	0,001	$8,5 \times 10^7$	$5,2 \times 10^8$
		PTFE	$5,6 \times 10^4$ ($7,1 \times 10^6$)	1,000	$-9,2 \times 10^7$	$3,1 \times 10^8$
	Dox-MNs	HA	$-3,5 \times 10^5$ ($7,6 \times 10^6$)	0,000	$-5,5 \times 10^8$	$-1,2 \times 10^8$
		MNs	$-1,1 \times 10^5$ ($7,6 \times 10^6$)	0,001	$-5,2 \times 10^8$	$-8,5 \times 10^7$
		PTFE	$-5,6 \times 10^4$ ($7,1 \times 10^6$)	0,078	$-3,9 \times 10^8$	$1,1 \times 10^7$
	PTFE	HA	$-2,9 \times 10^5$ ($7,1 \times 10^6$)	0,429	$-3,5 \times 10^8$	$5,4 \times 10^7$
		MNs	$-5,6 \times 10^4$ ($7,1 \times 10^6$)	1,000	$-3,1 \times 10^8$	$9,2 \times 10^7$
		Dox-MNs	$5,6 \times 10^4$ ($7,1 \times 10^6$)	0,078	$-1,1 \times 10^7$	$3,9 \times 10^8$
48h	HA	MNs	$3,5 \times 10^6$ ($7,6 \times 10^6$)	0,024	$1,8 \times 10^7$	$4,5 \times 10^8$
		Dox-MNs	$3,6 \times 10^6$ ($7,6 \times 10^6$)	0,000	$1,7 \times 10^8$	$6,0 \times 10^8$
		PTFE	$3,5 \times 10^6$ ($7,6 \times 10^6$)	0,027	$1,5 \times 10^7$	$4,5 \times 10^8$
	MNs	HA	$-3,5 \times 10^6$ ($7,6 \times 10^6$)	0,024	$-4,5 \times 10^8$	$-1,8 \times 10^7$
		Dox-MNs	$1,4 \times 10^5$ ($7,6 \times 10^6$)	0,529	$-6,5 \times 10^7$	$3,7 \times 10^8$
		PTFE	$8,1 \times 10^4$ ($7,6 \times 10^6$)	1,000	$-2,2 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$
	Dox-MNs	HA	$-3,6 \times 10^6$ ($7,6 \times 10^6$)	0,000	$-6,0 \times 10^8$	$-1,7 \times 10^8$
		MNs	$-1,4 \times 10^5$ ($7,6 \times 10^6$)	0,529	$-3,7 \times 10^8$	$6,5 \times 10^7$
		PTFE	$-6,2 \times 10^4$ ($7,6 \times 10^6$)	0,480	$-3,7 \times 10^8$	$6,2 \times 10^7$
	PTFE	HA	$-3,5 \times 10^6$ ($7,6 \times 10^6$)	0,027	$-4,5 \times 10^8$	$-1,5 \times 10^7$
		MNs	$-8,1 \times 10^4$ ($7,6 \times 10^6$)	1,000	$-2,1 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$
		Dox-MNs	$6,2 \times 10^4$ ($7,6 \times 10^6$)	0,480	$-6,2 \times 10^7$	$3,7 \times 10^8$
72h	HA	MNs	$1,8 \times 10^7$ ($7,6 \times 10^6$)	1,000	$-3,4 \times 10^8$	$9,7 \times 10^7$
		Dox-MNs	$2,3 \times 10^8$ * ($7,6 \times 10^6$)	1,000	$-1,5 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$
		PTFE	$2,3 \times 10^7$ ($8,5 \times 10^6$)	1,000	$-2,8 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$
	MNs	HA	$-1,8 \times 10^7$ ($7,6 \times 10^6$)	1,000	$-9,7 \times 10^7$	$3,4 \times 10^8$
		Dox-MNs	$5,3 \times 10^6$ ($7,6 \times 10^6$)	0,194	$-3,6 \times 10^7$	$4,0 \times 10^8$
		PTFE	$4,8 \times 10^6$ ($8,5 \times 10^6$)	1,000	$-1,6 \times 10^8$	$3,2 \times 10^8$
	Dox-MNs	HA	$-2,3 \times 10^8$ * ($7,6 \times 10^6$)	1,000	$-2,8 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$
		MNs	$-5,3 \times 10^6$ ($7,6 \times 10^6$)	0,194	$-4,0 \times 10^8$	$3,6 \times 10^7$
		PTFE	$-4,6 \times 10^5$ ($8,5 \times 10^6$)	1,000	$-3,4 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$
	PTFE	HA	$-2,3 \times 10^7$ ($8,5 \times 10^6$)	1,000	$-2,0 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$
		MNs	$-4,8 \times 10^6$ ($8,5 \times 10^6$)	1,000	$-3,2 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$
		Dox-MNs	$4,6 \times 10^5$ ($8,5 \times 10^6$)	1,000	$-1,4 \times 10^8$	$3,4 \times 10^8$

* La diferencia de medias es significativa ($p < 0,05$). DE, Desviación estándar; IC, Intervalo de confianza; HA, *biofilm* en discos de hidroxiapatita no recubiertos con membrana; MNs, *biofilm* en HA recubierto con membrana nanoestructurada activa sin cargar; Dox-MNs, *biofilm* en HA recubierto con MNs cargadas con doxiciclina; PTFE, *biofilm* en discos de HA cubierto con una membrana comercial.

Tabla 12. Efecto de las MNs en el número medio de *A. actinomycetemcomitans* medido por qPCR: modelo de regresión lineal general. Los resultados se expresan como diferencia de medias de las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL).

<i>F. nucleatum</i>			Diferencia de medias [UFC/mL (DE)]	P	IC 95% para diferencia	
					Inferior	Superior
12h	HA	MNs	$-6,6 \times 10^6$ ($4,5 \times 10^7$)	0,011	$3,6 \times 10^7$	$4,7 \times 10^8$
		Dox-MNs	$1,3 \times 10^7$ ($4,5 \times 10^7$)	0,000	$1,2 \times 10^8$	$5,5 \times 10^8$
		PTFE	$7,4 \times 10^5$ ($5,0 \times 10^7$)	0,041	$5,2 \times 10^6$	$4,9 \times 10^8$
	MNs	HA	$6,6 \times 10^6$ ($4,5 \times 10^7$)	0,011	$-4,7 \times 10^8$	$-3,6 \times 10^7$
		Dox-MNs	$2,0 \times 10^7$ ($4,5 \times 10^7$)	1,000	$-1,3 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$
		PTFE	$7,3 \times 10^6$ ($5,0 \times 10^7$)	1,000	$-2,5 \times 10^8$	$2,4 \times 10^8$
	Dox-MNs	HA	$-1,3 \times 10^7$ ($4,5 \times 10^7$)	0,000	$-5,5 \times 10^8$	$-1, \times 10^8$
		MNs	$-2,0 \times 10^7$ ($4,5 \times 10^7$)	1,000	$-3,0 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$
		PTFE	$-1,2 \times 10^7$ ($5,0 \times 10^7$)	1,000	$-3,3 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$
	PTFE	HA	$-7,4 \times 10^5$ ($5,0 \times 10^7$)	0,041	$-4,9 \times 10^8$	$-5,2 \times 10^6$
		MNs	$-7,3 \times 10^6$ ($5,0 \times 10^7$)	1,000	$-2,4 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$
		Dox-MNs	$1,2 \times 10^7$ ($5,0 \times 10^7$)	1,000	$-1,5 \times 10^8$	$3,3 \times 10^8$
24h	HA	MNs	$-3,7 \times 10^7$ ($4,5 \times 10^7$)	1,000	$-1,8 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$
		Dox-MNs	$5,7 \times 10^7$ ($4,5 \times 10^7$)	0,000	$1,2 \times 10^8$	$5,5 \times 10^8$
		PTFE	$-3,3 \times 10^7$ ($4,2 \times 10^7$)	0,429	$-5,4 \times 10^7$	$3,5 \times 10^8$
	MNs	HA	$3,7 \times 10^7$ ($4,5 \times 10^7$)	1,000	$-2,5 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$
		Dox-MNs	$9,4 \times 10^7$ ($4,5 \times 10^7$)	0,001	$8,5 \times 10^7$	$5,2 \times 10^8$
		PTFE	$4,0 \times 10^6$ ($4,2 \times 10^7$)	1,000	$-9,2 \times 10^7$	$3,1 \times 10^8$
	Dox-MNs	HA	$-5,7 \times 10^7$ ($4,5 \times 10^7$)	0,000	$-5,5 \times 10^8$	$-1,2 \times 10^8$
		MNs	$-9,4 \times 10^7$ ($4,5 \times 10^7$)	0,001	$-5,2 \times 10^8$	$-8,5 \times 10^7$
		PTFE	$-9,0 \times 10^7$ ($4,2 \times 10^7$)	0,078	$-3,9 \times 10^8$	$1,1 \times 10^7$
	PTFE	HA	$3,3 \times 10^7$ ($4,2 \times 10^7$)	0,429	$-3,5 \times 10^8$	$5,4 \times 10^7$
		MNs	$-4,0 \times 10^8$ ($4,2 \times 10^7$)	1,000	$-3,1 \times 10^8$	$9,2 \times 10^7$
		Dox-MNs	$9,0 \times 10^7$ ($4,2 \times 10^7$)	0,078	$-1,1 \times 10^7$	$3,9 \times 10^8$
48h	HA	MNs	$7,7 \times 10^7$ ($4,5 \times 10^7$)	0,024	$1,8 \times 10^7$	$4,5 \times 10^8$
		Dox-MNs	$1,4 \times 10^8$ ($4,5 \times 10^7$)	0,000	$1,7 \times 10^8$	$6,0 \times 10^8$
		PTFE	$1,5 \times 10^7$ ($4,5 \times 10^7$)	0,027	$1,5 \times 10^7$	$4,5 \times 10^8$
	MNs	HA	$-7,7 \times 10^7$ ($4,5 \times 10^7$)	0,024	$-4,5 \times 10^8$	$-1,8 \times 10^7$
		Dox-MNs	$5,9 \times 10^7$ ($4,5 \times 10^7$)	0,529	$-6,5 \times 10^7$	$3,7 \times 10^8$
		PTFE	$-6,2 \times 10^7$ ($4,5 \times 10^7$)	1,000	$-2,2 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$
	Dox-MNs	HA	$-1,4 \times 10^8$ ($4,5 \times 10^7$)	0,000	$-6,0 \times 10^8$	$-1,7 \times 10^8$
		MNs	$-5,9 \times 10^7$ ($4,5 \times 10^7$)	0,529	$-3,7 \times 10^8$	$6,5 \times 10^7$
		PTFE	$-1,2 \times 10^8$ ($4,5 \times 10^7$)	0,480	$-3,7 \times 10^8$	$6,2 \times 10^7$
	PTFE	HA	$-1,5 \times 10^7$ ($4,5 \times 10^7$)	0,027	$-4,5 \times 10^8$	$-1,5 \times 10^7$
		MNs	$6,2 \times 10^7$ ($4,5 \times 10^7$)	1,000	$-2,1 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$
		Dox-MNs	$1,2 \times 10^8$ ($4,5 \times 10^7$)	0,480	$-6,2 \times 10^7$	$3,7 \times 10^8$
72h	HA	MNs	$5,1 \times 10^7$ ($4,5 \times 10^7$)	1,000	$-3,4 \times 10^8$	$9,7 \times 10^7$
		Dox-MNs	$1,0 \times 10^8$ ($4,5 \times 10^7$)	1,000	$-1,5 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$
		PTFE	$6,8 \times 10^7$ ($5,0 \times 10^7$)	1,000	$-2,8 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$
	MNs	HA	$-5,1 \times 10^7$ ($4,5 \times 10^7$)	1,000	$-9,7 \times 10^7$	$3,4 \times 10^8$
		Dox-MNs	$5,1 \times 10^7$ ($4,5 \times 10^7$)	0,194	$-3,6 \times 10^7$	$4,0 \times 10^8$
		PTFE	$1,6 \times 10^7$ ($5,0 \times 10^7$)	1,000	$-1,6 \times 10^8$	$3,2 \times 10^8$
	Dox-MNs	HA	$-1,0 \times 10^8$ ($4,5 \times 10^7$)	1,000	$-2,8 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$
		MNs	$-5,1 \times 10^7$ ($4,5 \times 10^7$)	0,194	$-4,0 \times 10^8$	$3,6 \times 10^7$
		PTFE	$-3,5 \times 10^7$ ($5,0 \times 10^7$)	1,000	$-3,4 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$
	PTFE	HA	$-6,8 \times 10^7$ ($5,0 \times 10^7$)	1,000	$-2,0 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$
		MNs	$-1,6 \times 10^7$ ($5,0 \times 10^7$)	1,000	$-3,2 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$
		Dox-MNs	$3,5 \times 10^7$ ($5,0 \times 10^7$)	1,000	$-1,4 \times 10^8$	$3,4 \times 10^8$

* La diferencia de medias es significativa ($p < 0,05$). DE, Desviación estándar; IC, Intervalo de confianza; HA, *biofilm* en discos de hidroxiapatita no recubiertos con membrana; MNs, *biofilm* en HA recubierto con membrana nanoestructurada activa sin cargar; Dox-MNs, *biofilm* en HA recubierto con MNs cargadas con doxiciclina; PTFE, *biofilm* en discos de HA cubierto con una membrana comercial.

6. DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio aportan una información relevante que podría ser utilizada para el manejo de las enfermedades periodontales, ya que proporciona evidencia de que las membranas nanoestructuradas producen alteraciones en el crecimiento y la viabilidad celular del *biofilm*, destacando el efecto de las membranas cargadas con doxiciclina que son capaces de reducir significativamente la carga bacteriana de los patógenos periodontales *S. oralis*, *A. naeslundii*, *V. parvula*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*.

Los avances recientes en el campo de la Nanotecnología han despertado el interés de investigadores de múltiples áreas, incluyendo la Medicina y la Odontología. En particular, en regeneración ósea periodontal, diversos grupos de investigación han diseñado membranas de estructura nanofibrosa que mimetizan la estructura y composición del hueso (Münchow y cols. 2015, 2016, Augustine y cols. 2014, Osorio y cols. 2017), con propiedades ideales que favorecen la interacción célula-célula y célula-membrana, como son su pequeño tamaño y elevada porosidad y relación superficie-volumen (Ngiam y cols. 2011). También han despertado un interés considerable en el ámbito del desarrollo farmacológico, ya que se ha sugerido que estas características las hacen ideales como vehículos para la liberación controlada de fármacos (Repanas y cols. 2016). Así pues, se están probando nanomateriales cargados con agentes antimicrobianos para diferentes aplicaciones (Bottino y cols. 2014, He y cols. 2015, 2017, Xue y cols. 2014, 2015, Tang y cols. 2016, Monteiro y cols. 2017, Ranjbar-Mohammadi y cols. 2016).

Las membranas poliméricas nanoestructuradas basadas en polimetilmetacrilato (PMMA) que se proponen en la presente investigación para regeneración tisular guiada, fueron caracterizadas y evaluadas previamente por Osorio y cols. (2017). La caracterización se llevó a cabo en múltiples parámetros como: morfología de la superficie (porosidad, tamaño del poro y rugosidad), propiedades mecánicas, bioactividad estática *in vitro* y caracterización biológica mediante métodos de cultivo celular. Los valores de rugosidad de la superficie estuvieron entre 82,74

nm y 137,07 nm, dentro del rango favorable para la diferenciación osteogénica y formación de la matriz extracelular (Bruzauskaite y cols. 2016). El diámetro de las nanofibras fue de alrededor de 300 nm, imitando a las fibras de colágeno (Ma 2008), lo cual se ha demostrado que mejora la adhesión celular aproximadamente en 1,7 veces y la absorción selectiva de proteínas (fibronectina y vitronectina) (Woo y cols. 2003). Del mismo modo, se ha comprobado que esta estructura nanofibrosa mejora, además, la expresión del fenotipo osteoblástico y la mineralización (Woo y cols. 2007). Por otra parte, Osorio y colaboradores (2017) observaron como las membranas no fueron citotóxicas y no alteraron la viabilidad celular, por lo que es probable que sean seguras para su uso *in vivo*. Sin embargo, no fue probada la efectividad antibacteriana de las membranas propuestas para prevenir y controlar infecciones.

Debido al constante desafío microbiológico que supone la cavidad oral, se hace necesario desarrollar biomateriales clínicamente efectivos y capaces de mantener un ambiente libre de bacterias para la regeneración de los tejidos periodontales. Así pues, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto antibacteriano de estas membranas nanoestructuradas bioactivas y citocompatibles y las mismas cargadas con doxiciclina. La variable respuesta primaria fueron las unidades formadoras de colonia (UFC/mL), determinada mediante qPCR, para cada tiempo de incubación (12, 24, 48 y 72 horas) y para cada tipo de membrana (HA, PTFE, MNs, Dox-MNs). Se definieron los recuentos de las bacterias totales y los recuentos específicos de cada especie empleada en el modelo de *biofilm*. Las membranas demostraron reducir la carga bacteriana con respecto al control de HA, con diferencias significativas a las 12 ($p=0,05$) y a las 48 horas ($p=0,001$). Los resultados destacaron el efecto de las membranas cargadas con doxiciclina, mostrando, en todos los casos, un número menor en el recuento bacteriano con respecto al resto de superficies estudiadas, con diferencias significativas en algunos de ellos: para *S. oralis* a las 12, 24 y 48 h frente a HA ($p=0,000$) y en comparación con MNs a las 24 h ($p=0,001$); para *A. naeslundii* a las 48 h de incubación, con respecto a todos los grupos (HA, $p=0,000$; MNs, $p=0,007$; PTFE, $p=0,015$); para *V. parvula* a las 48 h en comparación con HA

($p=0,000$) y a las 72 h frente a MNs ($p=0,004$); para *F. nucleatum* a las 48 h con respecto a HA ($p=0,000$) y para *P. gingivalis* a las 72 h de incubación en comparación con HA ($p=0,049$).

Después de la etapa inicial de formación del *biofilm*, se pudieron observar las siguientes fases de crecimiento bacteriano exponencial, a excepción del *biofilm* en contacto con las Dox-MNs, donde hubo una disminución del número de unidades formadoras de colonias, posiblemente debido al potencial antimicrobiano del antibiótico cargado en las membranas nanoestructuradas. Solo éstas produjeron una reducción significativa en el recuento total de bacterias viables evaluadas por qPCR. Además, fueron capaces de reducir las UFC/mL de todas las bacterias periodontopatógenas evaluadas, con diferencias significativas en todos los casos, excepto para *A. actinomycetemcomitans*, aunque mostró una tendencia a la significación estadística ($p=0,057$). Estos resultados concuerdan con los encontrados en el estudio de Rodrigues y colaboradores (2004), donde observaron que ésta era una de las bacterias más resistentes a tetraciclinas. Además, parece que las membranas nanoestructuradas cargadas con doxicilina fueron capaces de frenar la cinética del *biofilm*, no permitiendo su dinámica habitual. Los agentes antimicrobianos se han usado comúnmente como coadyuvantes al tratamiento periodontal quirúrgico o no quirúrgico. Sin embargo, una de las principales causas del fallo del tratamiento es la resistencia a los antibióticos como consecuencia de su uso indiscriminado a lo largo del tiempo (van Winkelhoff y cols. 2000). Rodrigues y colaboradores (2004) evaluaron la resistencia de la microbiota subgingival de pacientes con periodontitis tratados con tetraciclina de forma sistémica o local como tratamiento coadyuvante al raspado y alisado radicular y observaron una menor proporción de especies resistentes en el grupo tratado con el antibiótico local. Por lo tanto, las membranas que se presentan podrían suponer también una alternativa para el manejo de las resistencias antibióticas.

La doxiciclina es un antibiótico bacteriostático de amplio espectro, perteneciente al grupo de tetraciclinas, que actúa mediante inhibición de la síntesis proteica, con actividad antimicrobiana frente a numerosos patógenos periodontales

(Pascale y cols. 1986). Es capaz de alcanzar concentraciones elevadas en el fluido crevicular gingival (Pascale y cols. 1986, Walker y cols. 1981) y exhibir un cierto grado de sustantividad, uniéndose a la superficie del diente y prolongando así el efecto terapéutico (Demirel y cols. 1991). Por otra parte, ha demostrado tener propiedades que podrían ayudar en la regeneración periodontal y en la reducción de la progresión de la periodontitis, por su acción anti-colagenolítica y anti-proteolítica (Golub y cols. 1984, 1985). Pese a todas estas ventajas asociadas al uso de la doxicilina, los resultados en la literatura son controvertidos. Se ha utilizado en diferentes concentraciones junto con injertos óseos y membranas de regeneración. Chang y Yamada (2000) en un estudio de experimentación animal, analizaron el efecto de una membrana reabsorbible de ácido poliglicólico-copoliláctico (PLGA) cargadas con un 25% de doxiciclina y observaron mayor formación de nuevo hueso y menor reabsorción de la cresta ósea, con respecto al grupo control, sugiriendo un efecto beneficioso de las membranas cargadas con doxiciclina en la osteogénesis y, por lo tanto, en la regeneración periodontal. Gireddy y colaboradores (2015) llevaron a cabo un ensayo clínico aleatorizado sobre 16 pacientes en el que evaluaron el efecto de una membrana reabsorbible de colágeno recubierta por 100 mg de doxiciclina y observaron diferencias significativas en cuanto al recuento bacteriano de *P. gingivalis* y *Prevotella intermedia* así como en la profundidad de sondaje, la ganancia de inserción clínica y el relleno óseo radiográfico del defecto. Kaur y Sikri (2013) realizaron otro ensayo clínico aleatorizado en 15 pacientes, de diseño a boca partida, para evaluar el efecto de un injerto de hueso solo o en combinación con un polvo de doxiciclina (100 mg). En un estudio similar sobre 24 pacientes, Chaturvedi y colaboradores (2008) analizaron el efecto de cargar o no con doxiciclina (25%) una membrana reabsorbible. Los resultados de ambos ensayos clínicos exhibieron una reducción en la profundidad de sondaje y una ganancia en el nivel de inserción clínica, con diferencias significativas a favor del grupo de doxiciclina. Sin embargo, otros autores no pudieron encontrar diferencias significativas (Lyons y cols. 2008, Eickholz y cols. 2014, Agarwal y Gupta 2015).

En el contexto de las membranas nanoestructuradas, la técnica de electrohilado o “*electrospinning*” tiene el potencial de producir membranas nanoestructuradas que imitan la estructura fibrosa de la matriz extracelular. También permite, de una forma simple y efectiva, funcionalizar estas membranas incorporando agentes bioactivos en la matriz de polímero, sin la necesidad de un proceso de preparación complejo. Estas técnicas de nanotecnología, como se mencionó anteriormente, han despertado el interés de muchos grupos de investigación en diversas áreas de la medicina y la odontología, pero especialmente en regeneración de tejidos y liberación controlada de fármacos. Recientemente, han surgido un gran número de publicaciones con diferentes propuestas de membranas nanofibrosas generadas mediante electrohilado para la liberación controlada de fármacos, con el objetivo de reducir las complicaciones infecciosas y propiciar la regeneración periodontal cuando se emplean en GTR (Karuppuswamy y cols. 2015, He y cols. 2015, 2017, Xue y cols. 2014, 2015, Tang y cols. 2016, Zamani y cols. 2010, Ranjbar-Mohammadi y cols. 2016, Monteiro y cols. 2017, Bottino y cols. 2014). Sin embargo, es difícil establecer comparaciones debido a la heterogeneidad de los estudios, en términos del polímero y del fármaco empleado para la fabricación de las membranas, así como la metodología de análisis. Si bien diversos de ellos han evaluado el efecto antibacteriano de membranas nanoestructuradas fabricadas con técnicas de “*electrospinning*”, éstas se basaron principalmente en policaprolactona (PCL) y, en menor medida, en ácido poliláctico-co-poliglicólico (PLGA). Ambos son polímeros sintéticos biodegradables que formaban parte de membranas reabsorbibles. Sin embargo, para la fabricación de las membranas que se presentan en esta investigación, se empleó polimetilmetacrilato (PMMA), un polímero biocompatible no reabsorbible que ha sido ampliamente usado debido a su excelente compatibilidad tisular (Feuser y cols. 2014). Por otra parte, las membranas fueron cargadas con diferentes agentes antimicrobianos: iones metálicos de efecto antibacteriano probado como el Calcio (Münchow y cols. 2016) o el Zinc (Augustine y cols. 2014, Münchow y cols. 2015), y diferentes antibióticos como metronidazol (He y cols. 2015, 2017, Xue y cols. 2014, 2015, Zamani y cols. 2010, Bottino y cols. 2014), amoxicilina (Tang y cols. 2016) o tetraciclina (Chen

y cols. 2011, Karuppuswamy y cols. 2015, Monteiro y cols. 2017, Ranjbar-Mohammadi y cols. 2016). Muchos de ellos se centraron en la caracterización de las membranas y en evaluar la cinética de liberación del agente antimicrobiano, así como en realizar pruebas de citotoxicidad (Karuppuswamy y cols. 2015, Tang y cols. 2016, Zamani y cols. 2010). Otros evaluaron, además, la actividad antibacteriana, demostrando la efectividad de las membranas. Todos ellos determinaron la susceptibilidad a los antibióticos mediante el test de difusión en agar, midiendo el diámetro del halo de inhibición (Chen y cols. 2011, He y cols. 2015, 2017, Xue y cols. 2014, 2015, Ranjbar-Mohammadi y cols. 2016, Monteiro y cols. 2017, Bottino y cols. 2014). Sin embargo, en el presente estudio se evaluó el efecto antibacteriano mediante la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real cuantitativa (qPCR) que ha demostrado una mayor sensibilidad y capacidad diagnóstica (Kotsilkov y cols. 2015). Por otra parte, los estudios mencionados emplearon bacterias aisladas para los análisis. Sin embargo, la gran mayoría de las bacterias en la naturaleza y, por ende, en la cavidad oral, se encuentran organizadas en *biofilms*. Además, se sabe que estos microorganismos en comunidad poseen propiedades diferentes que cuando se encuentran en estado planctónico, siendo una de ellas la mayor resistencia a los agentes antimicrobianos (Gilbert y cols. 1997, Costerton y cols. 1999, Stewart y Costerton 2001, Gilbert y cols. 2002, Socransky y Haffajee 2002, Marsh y cols. 2011). Algunos estudios señalan que la concentración mínima inhibitoria (CMI) de un organismo puede aumentar entre 2 y 1000 veces más cuando se encuentra formando parte de un *biofilm* (Stewart y Costerton 2001), mientras que otros autores la sitúan en 250 veces mayor que la CMI de la misma especie en estado planctónico (Sedlacek y Walker 2007). Se han descrito diversos mecanismos de tolerancia a los agentes antimicrobianos (Hojo y cols. 2009), siendo uno de ellos que la matriz extracelular podría restringir la penetración de los agentes antimicrobianos, limitando su difusión al interior del *biofilm*, de manera que cuanto más pequeña sea una molécula, más fácil será que penetre. En este sentido, parece que el uso de la nanotecnología podría suponer una ventaja añadida. Tanto es así que Neethirajan y colaboradores (2014) propusieron el uso de la nanotecnología como solución para

el tratamiento y resistencia del *biofilm*, señalando que los nanomateriales proporcionan una ventaja sobre los materiales convencionales, dado que su escala se asemeja más a la de las reacciones biológicas que ocurren a nivel celular. Del mismo modo, el aumento de la relación superficie – volumen mejoraría la eficacia de estas reacciones al proporcionar una mayor superficie de reacción. No obstante, con la propuesta de las presentes membranas nanoestructuradas cargadas con doxicilina, este mecanismo podría verse resuelto, debido en parte a que el antibiótico se libera constantemente desde el fondo del *biofilm*, suprimiendo a los colonizadores primarios que son los responsables del anclaje.

A pesar de los numerosos avances que han proporcionado los nanomateriales para aplicaciones médicas, los riesgos para la salud que pueden suponer estas tecnologías son controvertidos y no se conocen lo suficiente. Las nuevas propiedades que poseen los nanomateriales, como su pequeño tamaño y el aumento del área superficial, pueden favorecer el paso del nanomaterial desde el sitio de exposición a otras partes del cuerpo, donde podrían acumularse y producir efectos adversos (Resnik y Tinkle 2007). Además, surgen otros grandes desafíos sobre aspectos reguladores y bioéticos en nanomedicina, que tienen que solucionarse antes de que un nuevo nanomaterial sea comercializado y usado en humanos (Pavodani y cols. 2015). Las iniciativas de regulación para controlar la fabricación y uso de la nanotecnología han aumentado en los últimos años. Organismos reguladores como la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) se están sensibilizando con el tema y publicaron una nueva guía sobre la regulación, incluyendo cuestiones como el tamaño de los nanomateriales que se utilizan y sus propiedades (Food and Drug Administration 2014). Etheridge y colaboradores (2013) realizaron una revisión sistemática con el objetivo de ofrecer una perspectiva del panorama actual sobre productos de nanomedicina y encontraron 247 biomateriales comercializados o en fase de investigación. Si bien no hay comercializada todavía ninguna membrana nanoestructurada para regeneración de tejidos y/o liberación controlada de fármacos, existen diversas propuestas comentadas anteriormente que se encuentran en fase de investigación preclínica. Así pues, los resultados de la presente investigación, junto con los de

Osorio y cols. (2017), sugieren que estas membranas nanoestructuradas cargadas con doxiciclina reúnen unas propiedades ideales para ser empleadas como sistemas de liberación controlada de fármacos en regeneración ósea periodontal. Han demostrado ser citocompatibles y promover la diferenciación celular y mineralización, así como reducir significativamente el recuento bacteriano total y de las bacterias periodontopatógenas incluidas en el modelo de *biofilm in vitro*. Hasta donde sabemos, el presente estudio es el primero que ha evaluado el efecto antibacteriano de unas membranas nanoestructuradas mediante un modelo validado de *biofilm* multi-especies *in vitro* (Sánchez y cols. 2011). Sin embargo, también se deben reconocer algunas limitaciones, que incluyen que solo tiene en consideración seis especies en comparación con el gran número de especies presentes en la bolsa periodontal, que es un modelo de *biofilm* estático y que no involucra el efecto de las células del sistema inmune en su configuración actual. No obstante, estos resultados deben interpretarse con cautela, siendo necesarios más estudios futuros en modelos animales *in vivo* que revelarán si las MNs presentadas podrían suponer un avance real en regeneración periodontal.

7. CONCLUSIONES

Las membranas fueron capaces de reducir la carga bacteriana con respecto al control de hidroxiapatita, destacando el efecto de las membranas nanoestructuradas cargadas con doxiciclina, que han demostrado ser efectivas reduciendo significativamente la carga bacteriana de los patógenos periodontales *S. oralis*, *A. naeslundii*, *V. parvula*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*, indicando su susceptibilidad al antibiótico. Estas características antibacterianas, junto con la probada citocompatibilidad y bioactividad, sugieren los beneficios particulares de las nanofibras para la liberación de fármacos y la regeneración periodontal.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, A. (2016). *La nanotecnología*. [Barcelona]: RBA.
- Agarwal, A., & Gupta, N. D. (2015). Combination of bone allograft, barrier membrane and doxycycline in the treatment of infrabony periodontal defects: A comparative trial. *Saudi Dent J*, **27**(3), 155-160.
- Augustine, R., Malik, H., Singhal, D., Mukherjee, A., Malakar, D., Kalarikkal, N., & Thomas, S. (2014). Electrospun polycaprolactone/ZnO nanocomposite membranes as biomaterials with antibacterial and cell adhesion properties. *J Polym Res*, **21**(3).
- Bartold, P. M., Gronthos, S., Ivanovski, S., Fisher, A., & Hutmacher, D. W. (2016). Tissue engineered periodontal products. *J Periodontal Res*, **51**(1), 1-15.
- Bhavikatti, S. K., Bhardwaj, S., & Prabhuji, M. L. (2014). Current applications of nanotechnology in dentistry: a review. *Gen Dent*, **62**(4), 72-77.
- Bottino, M. C., Arthur, R. A., Waeiss, R. A., Kamocki, K., Gregson, K. S., & Gregory, R. L. (2014). Biodegradable nanofibrous drug delivery systems: effects of metronidazole and ciprofloxacin on periodontopathogens and commensal oral bacteria. *Clin Oral Investig*, **18**(9), 2151-2158.
- Bottino, M. C., Thomas, V., & Janowski, G. M. (2011). A novel spatially designed and functionally graded electrospun membrane for periodontal regeneration. *Acta Biomater*, **7**(1), 216-224.
- Bottino, M. C., Thomas, V., Schmidt, G., Vohra, Y. K., Chu, T. M., Kowolik, M. J., & Janowski, G. M. (2012). Recent advances in the development of GTR/GBR membranes for periodontal regeneration: a materials perspective. *Dent Mater*, **28**(7), 703-721.
- Bravo, M., Almerich, J.M., Ausina, V., Avilés, P., Blanco, J.M., Canorea, E., Casals, E., Gómez, G. (2016). Encuesta de Salud Oral en España 2015,. *RCOE*, **21**(1), 8-48.
- Bruzauskaite, I., Bironaite, D., Bagdonas, E., & Bernotiene, E. (2016). Scaffolds and cells for tissue regeneration: different scaffold pore sizes-different cell effects. *Cytotechnology*, **68**(3), 355-369.
- Calamak, S., Shahbazi, R., Eroglu, I., Gultekinoglu, M., & Ulubayram, K. (2017). An overview of nanofiber-based antibacterial drug design. *Expert Opin Drug Discov*, **12**(4), 391-406.

- Chang, C. Y., & Yamada, S. (2000). Evaluation of the regenerative effect of a 25% doxycycline-loaded biodegradable membrane for guided tissue regeneration. *J Periodontol*, **71**(7), 1086-1093.
- Chen, J., Zhou, B., Li, Q., Ouyang, J., Kong, J., Zhong, W., & Xing, M. M. (2011). PLLA-PEG-TCH-labeled bioactive molecule nanofibers for tissue engineering. *Int J Nanomed*, **6**, 2533-2542.
- Chung, B. G., Kang, L., & Khademhosseini, A. (2007). Micro- and nanoscale technologies for tissue engineering and drug discovery applications. *Expert Opin Drug Discov*, **2**(12), 1653-1668.
- Cortellini, P., & Tonetti, M. (2015). Regenerative periodontal therapy. In J. Lindhe & N. Lang, *Clinical periodontology and implant dentistry* (6th ed., pp. 901-960). Oxford: Wiley Blackwell.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, **284**(5418), 1318-1322.
- Cullinan, M. P., Westerman, B., Hamlet, S. M., Palmer, J. E., Faddy, M. J., Lang, N. P., & Seymour, G. J. (2001). A longitudinal study of interleukin-1 gene polymorphisms and periodontal disease in a general adult population. *J Clin Periodontol*, **28**(12), 1137-1144.
- Darveau, R. P., Hajishengallis, G., & Curtis, M. A. (2012). Porphyromonas gingivalis as a potential community activist for disease. *J Dent Res*, **91**(9), 816-820.
- Demirel, K., Baer, P. N., & McNamara, T. F. (1991). Topical application of doxycycline on periodontally involved root surfaces in vitro: comparative analysis of substantivity on cementum and dentin. *J Periodontol*, **62**(5), 312-316.
- Disease, G. B. D., Injury, I., & Prevalence, C. (2016). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*, **388**(10053), 1545-1602.
- Eickholz, P., Rollke, L., Schacher, B., Wohlfeil, M., Dannewitz, B., Kaltschmitt, J., . & Kim, T. S. (2014). Enamel matrix derivative in propylene glycol alginate for treatment of infrabony defects with or without systemic doxycycline: 12- and 24-month results. *J Periodontol*, **85**(5), 669-675.
- Elkassas, D., & Arafa, A. (2017). The innovative applications of therapeutic nanostructures in dentistry. *Nanomed*, **13**(4), 1543-1562.

- Etheridge, M. L., Campbell, S. A., Erdman, A. G., Haynes, C. L., Wolf, S. M., & McCullough, J. (2013). The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products. *Nanomed*, **9**(1), 1-14.
- Fakruddin, M., Hossain, Z., & Afroz, H. (2012). Prospects and applications of nanobiotechnology: a medical perspective. *J Nanobiotechnology*, **10**, 31.
- Feuser, P., Gaspar, P., Ricci-Júnior, E., Silva, M., Nele, M., Sayer, C., & H. H. de Araújo, P. (2014). Synthesis and Characterization of Poly(Methyl Methacrylate) PMMA and Evaluation of Cytotoxicity for Biomedical Application. *Macromol Symp*, **343**(1), 65-69.
- Food and Drug Administration. (2014) Considering whether an FDA-Regulated product involves the application of nanotechnology. *US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Office of the Commissioner*.
- Gandhimathi, C., Venugopal, J. R., Tham, A. Y., Ramakrishna, S., & Kumar, S. D. (2015). Biomimetic hybrid nanofibrous substrates for mesenchymal stem cells differentiation into osteogenic cells. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, **49**, 776-785.
- Gardin, C., Ferroni, L., Favero, L., Stellini, E., Stomaci, D., Sivoletta, S., Diego, D., Stefano, S., Eriberto, B., & Zavan, B. (2012). Nanostructured biomaterials for tissue engineered bone tissue reconstruction. *Int J Mol Sci*, **13**(1), 737-757.
- Gilbert, P., Das, J., & Foley, I. (1997). Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res*, **11**(1), 160-167.
- Gilbert, P., Maira-Litran, T., McBain, A. J., Rickard, A. H., & Whyte, F. W. (2002). The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities. *Adv Microb Physiol*, **46**, 202-256.
- Gireddy, H.B., Koduganti, R.R., Nandakamur, S., Surya, J., Reddy, V., & Dasari, R. (2016). Treatment of intrabony defects by drug coated membrane vs resorbable membrane only: a clinical, microbiological & radiological evaluation. *J Res Adv Dent*, **5**(1), 337-343.
- Golub, L. M., Goodson, J. M., Lee, H. M., Vidal, A. M., McNamara, T. F., & Ramamurthy, N. S. (1985). Tetracyclines Inhibit Tissue Collagenases: Effects of Ingested Low-Dose and Local Delivery Systems. *J Periodontol*, **56 Suppl 11S**, 93-97.
- Golub, L. M., Ramamurthy, N., McNamara, T. F., Gomes, B., Wolff, M., & Casino, A. (1984). Tetracyclines inhibit tissue collagenase activity. A new

- mechanism in the treatment of periodontal disease. *J Periodontal Res*, **19**(6), 651-655.
- He, M., Xue, J., Geng, H., Gu, H., Chen, D., Shi, R., & Zhang, L. (2015). Fibrous guided tissue regeneration membrane loaded with anti-inflammatory agent prepared by coaxial electrospinning for the purpose of controlled release. *Appl Surf Sci*, **335**, 121-129.
- He, M., Jiang, H., Wang, R., Xie, Y., & Zhao, C. (2017). Fabrication of metronidazole loaded poly (epsilon-caprolactone)/zein core/shell nanofiber membranes via coaxial electrospinning for guided tissue regeneration. *J Colloid Interface Sci*, **490**, 270-278.
- Heitz-Mayfield, L., Tonetti, M. S., Cortellini, P., Lang, N. P., & European Research Group on, P. (2006). Microbial colonization patterns predict the outcomes of surgical treatment of intrabony defects. *J Clin Periodontol*, **33**(1), 62-68.
- Heitz-Mayfield, L. J., Trombelli, L., Heitz, F., Needleman, I., & Moles, D. (2002). A systematic review of the effect of surgical debridement vs non-surgical debridement for the treatment of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, **29 Suppl 3**, 92-102.
- Herrera, D., Matesanz, P., Bascones-Martinez, A., & Sanz, M. (2012). Local and systemic antimicrobial therapy in periodontics. *J Evid Based Dent Pract*, **12**(3 Suppl), 50-60.
- Hill, D. A., & Artis, D. (2010). Intestinal bacteria and the regulation of immune cell homeostasis. *Annu Rev Immunol*, **28**, 623-667.
- Hojo, K., Nagaoka, S., Ohshima, T., & Maeda, N. (2009). Bacterial Interactions in Dental Biofilm Development. *Journal Of Dental Research*, **88**(11), 982-990.
- Hu, J., Liu, X., & Ma, P. X. (2008). Induction of osteoblast differentiation phenotype on poly(L-lactic acid) nanofibrous matrix. *Biomaterials*, **29**(28), 3815-3821.
- Karring, T., Isidor, F., Nyman, S., & Lindhe, J. (1985). New attachment formation on teeth with a reduced but healthy periodontal ligament. *J Clin Periodontol*, **12**(1), 51-60.
- Karring, T., Nyman, S., & Lindhe, J. (1980). Healing following implantation of periodontitis affected roots into bone tissue. *J Clin Periodontol*, **7**(2), 96-105.

- Karuppuswamy, P., Reddy Venugopal, J., Navaneethan, B., Luwang Laiva, A., & Ramakrishna, S. (2018). Polycaprolactone nanofibers for the controlled release of tetracycline hydrochloride. *Materials Letters*, **141**, 180-186.
- Kassebaum, N., Bernabé, E., Dahiya, M., Bhandari, B., Murray, C., & Marcenes, W. (2014). Global Burden of Severe Periodontitis in 1990-2010. *Journal Of Dental Research*, **93**(11), 1045-1053.
- Kaur, K., & Sikri, P. (2013). Evaluation of the effect of allograft with doxycycline versus the allograft alone in the treatment of infrabony defects: A controlled clinical and radiographical study. *Dent Res J (Isfahan)*, **10**(2), 238-246.
- Kong, L. X., Peng, Z., Li, S. D., & Bartold, P. M. (2006). Nanotechnology and its role in the management of periodontal diseases. *Periodontol 2000*, **40**, 184-196.
- Kotsilkov, K., Popova, C., Boyanova, L., Setchanova, L., & Mitov, I. (2015). Comparison of culture method and real-time PCR for detection of putative periodontopathogenic bacteria in deep periodontal pockets. *Biotechnol Biotechnol Equip*, **29**(5), 996-1002.
- Kubinova, S., & Sykova, E. (2010). Nanotechnologies in regenerative medicine. *Minim Invasive Ther Allied Technol*, **19**(3), 144-156.
- Larsen, T. (2002). Susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* in biofilms to amoxicillin, doxycycline and metronidazole. *Oral Microbiol Immunol*, **17**(5), 267-271.
- Li, W., Cooper, J., Mauck, R., & Tuan, R. (2006). Fabrication and characterization of six electrospun poly(α -hydroxy ester)-based fibrous scaffolds for tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia*, **2**(4), 377-385.
- Lindhe, J., & Nyman, S. (1975). The effect of plaque control and surgical pocket elimination on the establishment and maintenance of periodontal health. A longitudinal study of periodontal therapy in cases of advanced disease. *Journal Of Clinical Periodontology*, **2**(2), 67-79.
- Lutolf, M., & Hubbell, J. (2005). Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol*, **23**(1), 47-55.
- Lyons, L. C., Weltman, R. L., Moretti, A. J., & Trejo, P. M. (2008). Regeneration of degree ii furcation defects with a 4% doxycycline hyclate bioabsorbable barrier. *J Periodontol*, **79**(1), 72-79.

- Ma, P. X. (2008). Biomimetic materials for tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*, **60**(2), 184-198.
- Machtei, E. E., Dunford, R. G., Norderyd, O. M., Zambon, J. J., & Genco, R. J. (1993). Guided tissue regeneration and anti-infective therapy in the treatment of class II furcation defects. *J Periodontol*, **64**(10), 968-973.
- Marcenes, W., Kassebaum, N., Bernabé, E., Flaxman, A., Naghavi, M., Lopez, A., & Murray, C. (2013). Global Burden of Oral Conditions in 1990-2010. *Journal Of Dental Research*, **92**(7), 592-597.
- Marsh, P. D. (2005). Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol*, **32 Suppl 6**, 7-15.
- Marsh, P. D., Moter, A., & Devine, D. A. (2011). Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. *Periodontol 2000*, **55**(1), 16-35.
- Matesanz-Pérez, P., García-Gargallo, M., Figuerro, E., Bascones-Martínez, A., Sanz, M., & Herrera, D. (2013). A systematic review on the effects of local antimicrobials as adjuncts to subgingival debridement, compared with subgingival debridement alone, in the treatment of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, **40**(3), 227-241.
- Melcher, A. (1976). On the Repair Potential of Periodontal Tissues. *J Clin Periodontol*, **47**(5), 256-260.
- Monteiro, A., Rocha, C., Oliveira, M., Gontijo, S., Agudelo, R., Sinisterra, R., & Cortés, M. (2018). Nanofibers containing tetracycline/ β -cyclodextrin: Physico-chemical characterization and antimicrobial evaluation. *Carbohydr polym*, **156**, 417-426.
- Munchow, E. A., Albuquerque, M. T., Zero, B., Kamocki, K., Piva, E., Gregory, R. L., & Bottino, M. C. (2015). Development and characterization of novel ZnO-loaded electrospun membranes for periodontal regeneration. *Dent Mater*, **31**(9), 1038-1051.
- Munchow, E. A., Pankajakshan, D., Albuquerque, M. T., Kamocki, K., Piva, E., Gregory, R. L., & Bottino, M. C. (2016). Synthesis and characterization of CaO-loaded electrospun matrices for bone tissue engineering. *Clin Oral Investig*, **20**(8), 1921-1933.
- Murugan, R., & Ramakrishna, S. (2006). Nano-featured scaffolds for tissue engineering: a review of spinning methodologies. *Tissue Eng*, **12**(3), 435-447.

- Needleman, I. G., Worthington, H. V., Giedrys-Leeper, E., & Tucker, R. J. (2006). Guided tissue regeneration for periodontal infra-bony defects. *Cochrane Database Syst Rev*(2), CD001724.
- Neethirajan, S., Clond, M., & Vogt, A. (2014). Medical Biofilms—Nanotechnology Approaches. *J Biomed Nanotech*, **10**(10), 2806-2827.
- Ngiam, M., Nguyen, L. T., Liao, S., Chan, C. K., & Ramakrishna, S. (2011). Biomimetic nanostructured materials: potential regulators for osteogenesis? *Ann Acad Med Singapore*, **40**(5), 213-222.
- Noguerol, B. & Lodra, J. C. (2011). Estudio DELPHI. Periodoncia en España, 2025. *Sociedad Española de Periodoncia*.
- Nowzari, H., Matian, F., & Slots, J. (1995). Periodontal pathogens on polytetrafluoroethylene membrane for guided tissue regeneration inhibit healing. *J Clin Periodontol*, **22**(6), 469-474.
- Nowzari, H., & Slots, J. (1994). Microorganisms in polytetrafluoroethylene barrier membranes for guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol*, **21**(3), 203-210.
- Nyman, S., Karring, T., Lindhe, J., & Planten, S. (1980). Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue. *J Clin Periodontol*, **7**(5), 394-401.
- Nyman, S., Lindhe, J., Karring, T., & Rylander, H. (1982). New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol*, **9**(4), 290-296.
- OECD/European Observatory on Health Systems and Policies (2017). *Spain: Country Health Profile 2017, State of Health in the EU*, OECD Publishing, Paris/European Observatory on Health Systems and Policies, Brussels.
- Osorio, R., Alfonso-Rodriguez, C. A., Osorio, E., Medina-Castillo, A. L., Alaminos, M., Toledano-Osorio, M., & Toledano, M. (2017). Novel potential scaffold for periodontal tissue engineering. *Clin Oral Investig*, **21**(9), 2695-2707.
- Owen, S. C., & Shoichet, M. S. (2010). Design of three-dimensional biomimetic scaffolds. *J Biomed Mater Res A*, **94**(4), 1321-1331.
- Pascale, D., Gordon, J., Lamster, I., Mann, P., Seiger, M., & Arndt, W. (1986). Concentration of doxycycline in human gingival fluid. *J Clin Periodontol*, **13**(9), 841-844.

- Paster, B. J., Boches, S. K., Galvin, J. L., Ericson, R. E., Lau, C. N., Levanos, V. A., Sahasrabudhe, A., & Dewhirst, F. E. (2001). Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol*, **183**(12), 3770-3783.
- Paster, B. J., Olsen, I., Aas, J. A., & Dewhirst, F. E. (2006). The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol 2000*, **42**, 80-87.
- Padovani, G., Feitosa, V., Sauro, S., Tay, F., Durán, G., Paula, A., & Durán, N. (2018). Advances in Dental Materials through Nanotechnology: Facts, Perspectives and Toxicological Aspects. *Trends Biotech*, **33**, 621-636.
- Peng, F., Yu, X., & Wei, M. (2011). In vitro cell performance on hydroxyapatite particles/poly(l-lactic acid) nanofibrous scaffolds with an excellent particle along nanofiber orientation. *Acta Biomater*, **7**(6), 2585-2592.
- Pham, Q. P., Sharma, U., & Mikos, A. G. (2006). Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review. *Tissue Eng*, **12**(5), 1197-1211.
- Potocnik, J. (2011) Commission recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial. *Off J Eur Union L*, **275**, 30-40.
- Ramseier, C. A., Rasperini, G., Batia, S., & Giannobile, W. V. (2012). Advanced reconstructive technologies for periodontal tissue repair. *Periodontol 2000*, **59**(1), 185-202.
- Ranjbar-Mohammadi, M., Zamani, M., Prabhakaran, M. P., Bahrami, S. H., & Ramakrishna, S. (2016). Electrospinning of PLGA/gum tragacanth nanofibers containing tetracycline hydrochloride for periodontal regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, **58**, 521-531.
- Repanas, A., Andriopoulou, S., & Glasmacher, B. (2018). The significance of electrospinning as a method to create fibrous scaffolds for biomedical engineering and drug delivery applications. *J Drug Deliv Sci Tech*, **31**, 137-146.
- Resnik, D. B., & Tinkle, S. S. (2007). Ethics in nanomedicine. *Nanomed*, **2**(3), 345-350.
- Rios, H., Bashutski, J., & Giannobile, W. (2015). Bone as a living organ. En J. Lindhe & N. P. Lang, *Clinical periodontology and implant dentistry* (6th ed., pp. 48-63). Oxford: Wiley Blackwell.

- Rios, H., Kaigler, D., Ramseier, C., Rasperini, G., & Giannobile, W. (2015). Periodontal wound healing. In J. Lindhe & N. P. Lang, *Clinical periodontology and implant dentistry* (6th ed., pp. 521-533). Oxford: Wiley Blackwell.
- Rodrigues, R. M., Goncalves, C., Souto, R., Feres-Filho, E. J., Uzeda, M., & Colombo, A. P. (2004). Antibiotic resistance profile of the subgingival microbiota following systemic or local tetracycline therapy. *J Clin Periodontol*, **31**(6), 420-427.
- Sahoo, S. K., Parveen, S., & Panda, J. J. (2007). The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomed*, **3**(1), 20-31.
- Saiz, E., Zimmermann, E. A., Lee, J. S., Wegst, U. G., & Tomsia, A. P. (2013). Perspectives on the role of nanotechnology in bone tissue engineering. *Dent Mater*, **29**(1), 103-115.
- Sam, G., & Pillai, B. R. (2014). Evolution of Barrier Membranes in Periodontal Regeneration-"Are the third Generation Membranes really here?". *J Clin Diagn Res*, **8**(12), 14-17.
- Sedlacek, M. J., & Walker, C. (2007). Antibiotic resistance in an in vitro subgingival biofilm model. *Oral Microbiol Immunol*, **22**(5), 333-339.
- Selvig, K., Kersten, B., Chamberlain, A., Wikesjö, U., & Nilvéus, R. (1992). Regenerative Surgery of Intrabony Periodontal Defects Using ePTFE Barrier Membranes: Scanning Electron Microscopic Evaluation of Retrieved Membranes Versus Clinical Healing. *J Periodontol*, **63**(12), 974-978.
- Seymour, G. J., & Taylor, J. J. (2004). Shouts and whispers: An introduction to immunoregulation in periodontal disease. *Periodontol 2000*, **35**, 9-13.
- Shin, H., Jo, S., & Mikos, A. G. (2003). Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials*, **24**(24), 4353-4364.
- Socransky, S. S., & Haffajee, A. D. (2002). Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000*, **28**, 12-55.
- Socransky, S. S., & Haffajee, A. D. (2005). Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000*, **38**, 135-187.
- Song, W., Yu, X., Markel, D. C., Shi, T., & Ren, W. (2013). Coaxial PCL/PVA electrospun nanofibers: osseointegration enhancer and controlled drug release device. *Biofabrication*, **5**(3), 035006.
- Stewart, P. S., & Costerton, J. W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, **358**, 135-138.

- Takahashi, N., Ishihara, K., Kato, T., & Okuda, K. (2006). Susceptibility of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to six antibiotics decreases as biofilm matures. *J Antimicrob Chemother*, **59**(1), 59-65.
- Tang, Y., Chen, L., Zhao, K., Wu, Z., Wang, Y., & Tan, Q. (2016). Fabrication of PLGA/HA (core)-collagen/amoxicillin (shell) nanofiber membranes through coaxial electrospinning for guided tissue regeneration. *Compos Sci Tech*, **125**, 100-107.
- Ulubayram, K., Calamak, S., Shahbazi, R., & Eroglu, I. (2015). Nanofibers based antibacterial drug design, delivery and applications. *Curr Pharm Des*, **21**(15), 1930-1943.
- van Winkelhoff, A. J., Herrera Gonzales, D., Winkel, E. G., Delleman-Kippuw, N., Vandenbroucke-Grauls, C. M., & Sanz, M. (2000). Antimicrobial resistance in the subgingival microflora in patients with adult periodontitis. A comparison between The Netherlands and Spain. *J Clin Periodontol*, **27**(2), 79-86.
- van Winkelhoff, A. J., & Winkel, E. G. (2005). Microbiological diagnostics in periodontics: biological significance and clinical validity. *Periodontol 2000*, **39**, 40-52.
- Walker, C. B., Gordon, J. M., McQuilkin, S. J., Niebloom, T. A., & Socransky, S. S. (1981). Tetracycline: levels of achievable in gingival crevice fluid and in vitro effect on subgingival organisms. Part II. Susceptibilities of periodontal bacteria. *J Periodontol*, **52**(10), 613-616.
- Woo, K. M., Chen, V. J., & Ma, P. X. (2003). Nano-fibrous scaffolding architecture selectively enhances protein adsorption contributing to cell attachment. *J Biomed Mater Res A*, **67**(2), 531-537.
- Woo, K. M., Jun, J. H., Chen, V. J., Seo, J., Baek, J. H., Ryoo, H. M., Kim, G. A., Somerman, M. J., & Ma, P. X. (2007). Nano-fibrous scaffolding promotes osteoblast differentiation and biomineralization. *Biomaterials*, **28**(2), 335-343.
- Xue, J., He, M., Liu, H., Niu, Y., Crawford, A., & Coates, P., Chen, D., Shi, R., & Zhang, L. (2014). Drug loaded homogeneous electrospun PCL/gelatin hybrid nanofiber structures for anti-infective tissue regeneration membranes. *Biomaterials*, **35**, 9395-9405.
- Xue, J., Shi, R., Niu, Y., Gong, M., Coates, P., Crawford, A., Chen, D., Tian, W., & Zhang, L. (2015). Fabrication of drug-loaded anti-infective guided tissue regeneration membrane with adjustable biodegradation property. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **135**, 846-854.

- Zamani, M., Morshed, M., Varshosaz, J., & Jannesari, M. (2010). Controlled release of metronidazole benzoate from poly epsilon-caprolactone electrospun nanofibers for periodontal diseases. *Eur J Pharm Biopharm*, **75**(2), 179-185.
- Zamani, M., Prabhakaran, M. P., & Ramakrishna, S. (2013). Advances in drug delivery via electrospun and electrosprayed nanomaterials. *Int J Nanomed*, **8**, 2997-3017.
- Zhang, L., Ramsaywack, S., Fenniri, H., & Webster, T. J. (2008). Enhanced osteoblast adhesion on self-assembled nanostructured hydrogel scaffolds. *Tissue Eng*, **14**(8), 1353-1364.
- Zucchelli, G., Sforza, N. M., Clauser, C., Cesari, C., & De Sanctis, M. (1999). Topical and systemic antimicrobial therapy in guided tissue regeneration. *J Periodontol*, **70**(3), 239-247.